

**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO
ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA SOBRE LA
MICROGLÍA EN REGIONES DEL SISTEMA
CORTICOLÍMBICO EN UN MODELO
PRECLÍNICO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE
ALCOHOL, FASE DE ABSTINENCIA Y RECAÍDA**

TESIS DOCTORAL

JESÚS ARANDA LÓPEZ

DIRECTORES

Dr. JUAN SUÁREZ PÉREZ

Dra. INÉS M^a SMITH FERNÁNDEZ

PROGRAMA DE DOCTORADO

BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA HUMANA, MEDICINA LEGAL E HISTORIA DE LA
CIENCIA**

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

2022



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: Jesús Aranda López

 <https://orcid.org/0000-0002-5626-5214>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

EFFECTOS DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA SOBRE LA MICROGLÍA EN REGIONES DEL SISTEMA CORTICOLÍMBICO EN UN MODELO PRECLÍNICO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL, FASE DE ABSTINENCIA Y RECAÍDA

Autor

JESÚS ARANDA LÓPEZ

Directores de tesis

Dr. Juan Suárez Pérez

Dra. Inés M^a Smith Fernández

Programa de doctorado

Biomedicina, Investigación Traslacional y Nuevas Tecnologías en Salud

Departamento de Anatomía Humana, Medicina Legal e Historia de la Ciencia

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

Málaga, 2022





DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D. JESÚS ARANDA LÓPEZ

Estudiante del programa de doctorado **BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD** de la Universidad de Málaga, autor de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: **EFFECTOS DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA SOBRE LA MICROGLIA EN REGIONES DEL SISTEMA CORTICOLÍMBICO EN UN MODELO PRECLÍNICO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL, FASE DE ABSTINENCIA Y RECAÍDA.**

Realizada bajo la tutorización de **LETICIA OLGA RUBIO LAMIA** y dirección de **JUAN SUÁREZ PEREZ E INÉS MARIA SMITH FERNÁNDEZ** (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a **9 de MAYO de 2022**





D. Juan Suárez Pérez

Profesor Contratado Doctor del Área de Medicina Legal y Forense de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D^a. Inés María Smith Fernández

Profesora Titular del Área de Anatomía y Embriología Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

D^a. Leticia Olga Rubio Lamia

Profesora Contratada Doctora del Área de Medicina Legal y Forense de la Facultad de Medicina de la Universidad de Málaga

CERTIFICA/N Que D. Jesús Aranda López

ha obtenido y estudiado personalmente bajo nuestra dirección los datos preclínicos necesarios para la realización de su Tesis Doctoral, titulada: "EFECTOS DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA SOBRE LA MICROGLÍA EN REGIONES DEL SISTEMA CORTICOLÍMBICO EN UN MODELO PRECLÍNICO DE AUTOADMINISTRACIÓN DE ALCOHOL, FASE DE ABSTINENCIA Y RECAÍDA", que considero tiene el contenido y rigor científico necesario para ser sometido al superior juicio de la Comisión que nombre la Universidad de Málaga para optar a grado de Doctor.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, expido el presente certificado en

En Málaga, a 3 de junio 2022

Directores:

<<Todos tenemos luz y oscuridad en nuestro interior: lo que importa es que parte decidimos potenciar>>

S.B.



Sudden cessation of fluoxetine before alcohol drinking reinstatement alters microglial morphology and TLR4/inflammatory neuroadaptation in the rat brain

Jesús Aranda^{1,2,3} · María del Mar Fernández-Arjona^{1,4,10} · Francisco Alén⁵ · Patricia Rivera^{1,4} · Leticia Rubio^{1,6} · Inés Smith-Fernández⁶ · Francisco Javier Pavón^{1,7} · Antonia Serrano^{1,4} · Pedro J. Serrano-Castro^{1,8,9} · Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,4,10} · Juan Suárez^{1,2,6,9,10} 

Received: 16 November 2020 / Accepted: 14 June 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Preclinical studies on the effects of abrupt cessation of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), a medication often prescribed in alcohol use disorder (AUD) patients with depression, results in alcohol consumption escalation after resuming drinking. However, a potential neuroinflammatory component on this escalation remains unexplored despite the immunomodulatory role of serotonin. Here, we utilized a rat model of 14-daily administration of the SSRI fluoxetine (10 mg/kg/day) along alcohol self-administration deprivation to study the effects of fluoxetine cessation on neuroinflammation after resuming alcohol drinking. Microglial morphology and inflammatory gene expression were analyzed in prelimbic cortex, striatum, basolateral amygdala and dorsal hippocampus. Results indicated that alcohol drinking reinstatement increased microglial IBA1 immunoreactivity and altered morphometric features of activated microglia (fractal dimension, lacunarity, density, roughness, and cell area, perimeter and circularity). Despite alcohol reinstatement, fluoxetine cessation modified microglial morphology in a brain region-specific manner, resulting in hyper-ramified (spatial complexity of branching), reactive (lower heterogeneity and circularity)-like microglia. We also found that microglial cell area correlated with changes in mRNA expression of chemokines (*Cx3cl1/fractalkine*, *Cxcl12/SDF1 α* , *Ccl2/MCP1*), cytokines (*IL1 β* , *IL6*, *IL10*) and the innate immune toll-like receptor 4 (*TLR4*) in dorsal hippocampus. Specifically, *TLR4* correlated with microglial spatial complexity assessed by fractal dimension in striatum, suggesting a role in process branching. These findings suggest that alcohol drinking reinstatement after fluoxetine treatment disturbs microglial morphology and reactive phenotype associated with a TLR4/inflammatory response to alcohol in a brain region-specific manner, facts that might contribute to alcohol-induced damage through the promotion of escalation of alcohol drinking behavior.

Keywords Alcohol · Antidepressant · Hippocampus · Inflammation · Microglia · Fractal dimension

Abbreviations

<i>BCD</i>	Bounding circle diameter	<i>CCL2/MCP1</i>	Monocyte chemoattractant protein-1
<i>BDNF</i>	Brain-derived neurotrophic factor	<i>CH</i>	Convex hull area (CHA), circularity (CHC), perimeter (CHP), and span ratio (CHSR)
<i>BLA</i>	Basolateral amygdala	<i>CP</i>	Cell perimeter
<i>CA</i>	Cell area	<i>CX3CL1</i>	Fractalkine
<i>CA1/CA3</i>	<i>cornu ammonis</i> Subfields 1 and 3 of the hippocampus	<i>CXCL12/SDF1</i>	Stromal cell derived factor 1
<i>CC</i>	Cell circularity	<i>D</i>	Fractal dimension
		<i>DG</i>	Dentate gyrus of the hippocampus
		<i>Gapdh</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
		<i>Gcl</i>	Granular cell layer
		<i>IBA-1</i>	Allograph inflammatory factor 1 or ionized calcium-binding adapter molecule 1
		<i>IL1β</i>	Interleukin 1 beta

✉ Fernando Rodríguez de Fonseca
fernando.rodriguez@ibima.eu

✉ Juan Suárez
juan.suarez@uma.es

Extended author information available on the last page of the article



AGRADECIMIENTOS

Hace años, me hice una promesa, pero nunca pensé que me llevaría a estar aquí, y todo ello te lo debo a ti, papá. Siempre me has demostrado tu apoyo incondicional, y tu ejemplo, por esto y mucho más, mil gracias.

Horas y horas de estudio, tumbado en mi regazo, dándome ese amor y apoyo que en mi vida se han convertido en pilares fundamentales. Esa fuerza digna de un dios, gracias Hércules.

Agradecer a mis hermanos, Jorge y Lourdes, que formen parte de mi vida, y sean partícipes de mi evolución como persona y profesional, gracias.

Como no, aunque lleve años sin poder verte, y sé que nunca podré volver a hacerlo, también soy muy consciente de que siempre estás ahí mamá... conmigo, y tu inolvidable sonrisa... esto también va por ti.

Agradecer también a la familia Cano Bernal, por tratarme como un igual desde el día en que nací, como mi familia.

A mis amigos, mi otro pilar en la vida, en especial a ti, Álvaro Martín, por haber tenido esa paciencia conmigo, y ayudarme en aspectos tan fundamentales de la vida. También quiero agradecerte a ti la suerte de haberte conocido, Bienvenido, como bien dice tu nombre, por haberme dado tanto en tan poco tiempo. A los dos, Álvaro y Bienvenido, mil gracias por estar ahí.

Gracias María, por darme esa energía tan positiva que me das todas las semanas desde el día en que te conocí.

También quiero agradecer a ciertas personas la posibilidad de haberlas conocido durante este trayecto profesional. Que estando o no hoy en día conmigo, me han ayudado a crecer como persona.

A mi tía Carmen, y mi abuela Ana, se que estéis donde estéis, siempre me dais fuerzas y amor. Y por supuesto, gracias a mi tía Ana, quien me dijo esa frase que siempre llevo en mi cabeza: <<si lloras porque se oculta el sol, las lágrimas te impedirán ver las estrellas>>.

Agradecer especialmente a mi director Juan Suárez la cantidad de conocimientos y habilidades que me ha enseñado estos años, y al equipo del LMR, sin vosotros esta etapa de mi vida no habría sido posible. Gracias, Patri, por darme ese sosiego y tranquilidad que muchas veces no era capaz de ver.

También quiero agradecer a mi compañero Enrique la paciencia que ha tenido conmigo en esta última etapa, por aguantarme lo inaguantable, gracias.

Finalmente, no hay palabras que puedan expresar el agradecimiento de haberme encontrado en la vida con vosotras, Leticia e Inés. Me visteis crecer, caerme, llorar, reír, y levantarme desde que empecé mis estudios de Enfermería, y siempre habéis estado ahí. Gracias por confiar en mí.

ÍNDICE

ÍNDICE

TESAURO	Pág.1
INDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES.....	Pág.4
0. INTRODUCCIÓN.....	Pág.10
1. EL ALCOHOL EN LA HISTORIA.....	Pág.10
2. EL CONSUMO DE ALCOHOL Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA.....	Pág.12
3. TOXICOLOGÍA DEL ALCOHOL.....	Pág.13
3.1. TRASTORNO POR CONSUMO/USO DE ALCOHOL (TUA).....	Pág. 15
4. EL SISTEMA DE RECOMPENSA EN LA ADICCIÓN (VÍA MESOCORTICOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA).....	Pág.16
4.1. REFUERZO POSITIVO Y REFUERZO NEGATIVO - RETROALIMENTACIÓN DE LA ADICCIÓN.....	Pág.19
4.2. OTROS NEUROTRANSMISORES/NEUROMODULADORES IMPLICADOS EN EL TUA.....	Pág.21
4.3. LA SEROTONINA EN EL TUA.....	Pág.22
5. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA EL TUA.....	Pág.24
5.1. EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y OTRAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL TUA.....	Pág.26
5.2. FARMACOTERAPIA DEL TUA Y SINTOMATOLOGÍA DEPRESIVA....	Pág.28
6. SISTEMA INMUNE Y NEUROINFLAMACIÓN.....	Pág.31
6.1. FACTORES INFLAMATORIOS EN LA RESPUESTA INMUNE.....	Pág.31
6.2. TLRs Y NEUROINFLAMACIÓN MEDIADA POR EL SISTEMA NEUROINMUNE.....	Pág.34
7. EL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL SNC – LA MICROGLÍA.....	Pág.37
7.1 DEFINICIÓN Y ASPECTOS CLAVE.....	Pág.37
7.2. ESTADOS FISIOLÓGICOS DE LA MICROGLÍA.....	Pág.38
7.2.1. MICROGLÍA EN ESTADO DE REPOSO.....	Pág.38
7.2.2. MICROGLÍA ACTIVADA O EN ESTADO PRO-INFLAMATORIO.....	Pág.40
7.2.3. MICROGLÍA EN ESTADO ANTI-INFLAMATORIO.....	Pág.41
7.3. COMUNICACIÓN MICROGLIAL: RECEPTORES, CITOCINAS Y QUIMIOCINAS.....	Pág.41
8. ANÁLISIS DE FORMA EN LA CÉLULA MICROGLIAL.....	Pág.42

ÍNDICE

0. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	Pág.48
JUSTIFICACION DE LA TESIS.....	Pág.48
1. HIPÓTESIS.....	Pág.49
2. OBJETIVO GENERAL.....	Pág.50
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	Pág.51
0. MATERIAL Y MÉTODO.....	Pág.53
0.	
ASPECTOS ÉTICOS.....	Pág.53
1. MODELO ANIMAL DE AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL.....	Pág.53
1.1. ANIMALES.....	Pág.53
1.2. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.....	Pág.54
1.3. AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL.....	Pág.55
1.4. TRATAMIENTO Y RECAÍDA AL AUTO-CONSUMO DE ALCOHOL....	Pág.57
2. TÉCNICAS.....	Pág.58
2.1. OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.....	Pág.58
2.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	Pág.60
2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (Niveles relativos de ARNm)....	Pág.64
2.4. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO.....	Pág.68
2.4.1. ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN.....	Pág.68
2.4.2. PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN.....	Pág.69
2.4.3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES...	Pág.73
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	Pág.77
IV. RESULTADOS.....	Pág.78
1.	
RESULTADOS	
EL CESE DEL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA AUMENTA EL AUTOCONSUMO DE ALCOHOL DURANTE LA REEXPOSICION.....	Pág.79
2. ANÁLISIS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA IBA-1 EN ÁREAS DEL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.80
2.1. EL CONSUMO DE ETANOL AUMENTA LA INMUNORREACTIVIDAD DE IBA-1 EN EL CEREBRO.....	Pág.80

ÍNDICE

3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA MICROGLÍA (IBA-1).....	Pág.84
3.1. EL CESE ABRUPTO DEL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA PREVIO A LA REINSTAURACIÓN DEL AUTOCONSUMO DE ALCOHOL PRODUCE CAMBIOS ESPECÍFICOS EN LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN DE ESTUDIO DEL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.84
3.1.1. EFECTO DEL ETANOL EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.85
3.1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA (ISRS) EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.87
3.1.3. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES ETANOL Y TRATAMIENTO.....	Pág.88
3.1.4. ANÁLISIS DE LOS EFECTOS SIMPLES.....	Pág.90
A. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA DIMENSIÓN FRACTAL, LA LACUNARIDAD, EL ÁREA, EL PERÍMETRO Y LA CIRCULARIDAD CELULAR.....	Pág.90
B. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA DENSIDAD, LA RUGOSIDAD, EL ÁREA DEL POLÍGONO CONVEXO, EL PERÍMETRO DEL POLÍGONO CONVEXO Y LA CIRCULARIDAD DEL POLÍGONO CONVEXO.....	Pág.92
C. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA RELACIÓN DE EXTENSIÓN DEL POLÍGONO CONVEXO (CHSR), EL DIÁMETRO DEL CÍRCULO LIMITANTE (BCD), LA EXTENSIÓN MÁXIMA A TRAVÉS DEL POLÍGONO CONVEXO (MSACH), EL COCIENTE ENTRE EL RADIO MÁXIMO Y EL RADIO MÍNIMO DE LOS CÍRCULOS LIMITANTES EXTERNO E INTERNO DEL POLÍGONO CONVEXO (RCHR) Y EL RADIO MEDIO.....	Pág.94
4. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MICROGLIAL Y LOS CAMBIOS EJERCIDOS POR LA FLUOXETINA EN LOS PRINCIPALES FACTORES INFLAMATORIOS Y TLR4 EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA. CAMBIOS ESPECÍFICOS EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN.....	Pág.99
4.1. CAMBIOS EJERCIDOS POR LA FLUOXETINA EN FACTORES INFLAMATORIOS DEL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.100
5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LA MICROGLÍA Y LA EXPRESIÓN DE ARNm DE FACTORES INFLAMATORIOS EN EL SISTEMA DE RECOMPENSA.....	Pág.101
6. RESULTADOS PRELIMINARES DE LA INMUNOSHISTOQUÍMICA DE QUIMIOCINAS EN REGIONES DEL HIPOCAMPO Y CAMBIOS	

ÍNDICE

INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS ASTROCITOS DEL CEREBRO – FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION.....	Pág.104
V. DISCUSIÓN.....	Pág.110
LIMITACIONES.....	Pág.125
VI. CONCLUSIONES.....	Pág.127
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	Pág.130
ANEXO.....	Pág.151

TESAURO

Ab I: Anticuerpo primario

Ab II: Anticuerpo secundario

ACe: Amígdala Central

Acetil CoA: Acetil coenzima A

ADH: Enzima alcohol deshidrogenasa

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AEA: Anandamida

ALDH: Enzima aldehído deshidrogenasa

AMPA: α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

Amy: Amígdala

ANSe: Antidepresivo Noradrenérgico y Serotoninérgico específico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

AT: Antidepresivo Tricíclico

ATV: Área Tegmental Ventral

BLA: Amígdala Basolateral

CCA: Corteza Cingulada Anterior

CE: Corteza Entorrinal

CM: Corteza Motora

COF: Corteza Orbitofrontal

CPF/PrL: Corteza Prefrontal Lateral/ Área Prelímbica

CH₃OH: Metanol

CX3CL1: Fractalquina

CX3CR1: Receptor del ligando CX3CL1/fractalquina

CYP450: Citocromo P450

DA: Dopamina

DAB: 3,3-Diaminobencidina (C₁₂H₁₄N₄)

DAMPs: Patrones Moleculares asociados al Daño

ESTUDES: Encuesta Escolar sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias

TESAURO

ETS: Enfermedad/es de Transmisión Sexual
GABA: Ácido Gama Aminobutírico
Gapdh: gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa
Glut: Glutamato
HC: Hipocampo Dorsal
HMGB1: Proteína 1 del Grupo de Alta Movilidad
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
IL1 β : Interleuquina 1 β
Il-6: Interleuquina 6
Il-4: Interleuquina 4
Il-10: Interleuquina 10
IrL: Corteza Infralímbica
ISRS: Inhibidores Selectivos de la Recaptación de la Serotonina
ISRSN: Inhibidores Selectivos de la Recaptación de la Serotonina y la Noradrenalina
LPS: Lipopolisacárido/s
MCP-1/CCL2: Proteína Quimioatrayente de Monocitos 1
MHC II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2
NAc: Núcleo Accumbens
NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
NF- κ B: Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NLR/NOD-Like Receptors: Receptores asociados al Dominio de Oligomerización de Unión a Nucleótidos
NMDA: N-metil-D-aspartato
NOP-1: Receptor opioide-1
OEA: Oleoiletanolamida
OMS: Organización Mundial de la Salud
PAMPs: Patrones Moleculares Exógenos Asociados a Patógenos
PRRs: Receptores de Patrones Moleculares
PB: Tampón Fosfato/Solución “*buffer*”
PBS: Tampón Fosfato Salino
PBS Tx-100: Tampón fosfato salino con tritón

TESAURO

PCR: Prueba de la reacción en cadena de la polimerasa
PPAR α : Receptor α Activado por Proliferador de Peroxisomas
RLR/RIR-I-Like receptors: Receptor asociado al Gen 1 inducible por ácido Retinóico
SDF-1/CXCL12: Factor 1 derivado de Células Estromales
SEC: Sistema Endocanabinoide
SNC: Sistema Nervioso Central
SNc: Sustancia Negra compacta
SGZ: Zona Subgranular
SL-M: Estrato Lacunosum-Moleculare
SR: Estrato Radiatum
Str: Estriado
SVZ: Zona Subventricular
TA: Temperatura Ambiente
TGFB1: Factor de Crecimiento Transformante B1
TLR: Receptor de Reconocimiento de Patrones
TLR4: Receptor de Reconocimiento de Patrones tipo 4
TNF α : Factor Necrótico Tisular α
Tris-PBS: Tampón fosfato salino con Tris
TUA: Trastorno por Uso de Alcohol (en inglés: AUD; “Alcohol Use Disorder”)
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana
VL: Ventrículo/s Lateral/es
5-HIAA: Ácido 5-Hidroxindolacético
5-HT: 5-Hydroxytryptamina/Serotonina

INDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES

ILUSTRACIONES

INTRODUCCIÓN

- ❖ **Ilustración 1.** Extracto del manuscrito “An essay on Drunkenness” redactado por Thomas Trotter (1804). **Pág. 10.**
- ❖ **Ilustración 2.** Gráfica extraída de Coupland & cols. Representando el número de prescripciones (en millones) de los tratamientos antidepresivos más empleados en el año 2016. **Pág. 29.**
- ❖ **Ilustración 3.** Imagen-esquema correspondientes al proceso de un estado de reposo a un estado activo de las células microgliales pertenecientes a la región de estudio PFC. **Pág. 39.**
- ❖ **Ilustración 4.** Imágenes correspondientes al área CA1 hipocampal donde se muestran las características morfológicas de las células microgliales en función de su estado de activación. **Pág. 43.**

MATERIAL Y MÉTODO

- ❖ **Ilustración 5.** Imagen-esquema del modelo animal empleado para el experimento de auto-administración de alcohol. **Pág. 55.**
- ❖ **Ilustración 6.** Imagen-esquema de los cortes axiales de principales áreas de interés del estudio, pertenecientes al SNC: la corteza prefrontal (PrL), el estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA), y el hipocampo dorsal (HC), más concretamente el área CA1 hipocampal (CA1). **Pág. 59.**
- ❖ **Ilustración 7.** Esquema de la selección de células de la microglía con un objetivo 60X para su posterior análisis morfométrico. **Pág.68.**

- ❖ **Ilustración 8.** Procesamiento de la imagen digital de la célula microglial. **Pág. 71.**
- ❖ **Ilustración 9.** 15 parámetros morfométricos empleados para el análisis de las imágenes correspondientes a las células microgliales del experimento. **Pág. 76.**

RESULTADOS

- ❖ **Ilustración 10.** Representación gráfica del autoconsumo de alcohol durante la reexposición tras el cese del tratamiento con fluoxetina. **Pág. 80.**
- ❖ **Ilustración 11.** Resultados de la prueba de Inmunohistoquímica IBA-1 en las áreas cerebrales corteza prefrontal (PrL), estriado (Str) y Amígdala Basolateral (BLA). **Pág. 82.**
- ❖ **Ilustración 12.** Resultados de la prueba de Inmunohistoquímica IBA-1 en el área cerebral del hipocampo (HC), concretamente las áreas correspondientes a giro dentado, CA1 Y CA3. **Pág. 83.**
- ❖ **Ilustración 13.** Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre los parámetros morfométricos: dimensión fractal (A – D), lacunaridad (E – H), área celular (I – L), perímetro celular (M – P) y circularidad celular (Q– T) en la microglía de la corteza prefrontal (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el área CA1 del hipocampo (HC). **Pág. 96.**
- ❖ **Ilustración 14.** Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre los parámetros morfométricos: área de CH (A – D), densidad (E – H), perímetro de CH (I – L), rugosidad (M – P) y circularidad de CH (Q – T) en la microglía de la corteza prefrontal (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo (HC) CA1. **Pág. 97.**

- ❖ **Ilustración 15.** Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol en los parámetros morfométricos: Cociente de amplitud de CH (A – D), BCD (E – H), MSACH (I – L), RCHR (M – P) y el radio medio (Q– T) en la microglia de la corteza prelámbica (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el área CA1 del hipocampo (HC). **Pág. 98.**
- ❖ **Ilustración 16.** Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina en ratas con restablecimiento del consumo de etanol sobre la expresión de ARNm de citocinas inflamatorias (Tnf α , IL1 β , IL6, IL4, IL10, TGF β , BDNF), quimiocinas (Cx3cl1, Cxcl12, Ccl2) y TLR4 en la corteza prelámbica (A), cuerpo estriado (B), amígdala basolateral (C) e hipocampo dorsal (D). **Pág. 103.**
- ❖ **Ilustración 17.** Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor CCR2 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateral de cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. **Pág. 106.**
- ❖ **Ilustración 18.** Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor de fractalquina/CX3CR1 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateral de cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. **Pág. 107.**
- ❖ **Ilustración .** Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor CXCR4 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateralde cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. **Pág. 107.**
- ❖ **Ilustración 19.** Resultados Preliminares de la prueba inmunohistoquímica GFAP en las áreas cerebrales estudiadas en el experimento en ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. **Pág. 109.**

DISCUSIÓN

- ❖ **Ilustración 20.** Representación esquemática que resume los principales efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre la morfología microglial y su asociación con el fenotipo reactivo (respuesta inflamatoria) en cada región del cerebro analizada. **Pág. 124.**

TABLAS

INTRODUCCIÓN

- ❖ **TABLA 1.** Distintos Modelos de exposición a alcohol generan una respuesta inflamatoria específica en función de la especie de estudio. Adaptada de la fuente: Robinson G, Most D, Ferguson LB, Mayfield J, Harris RA, Blednov YA. Neuroimmune pathways in alcohol consumption: evidence from behavioral and genetic studies in rodents and humans. Int Rev Neurobiol. 2014;118:13-39. doi: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00002-6. **Pág. 35.**

MATERIAL Y MÉTODO

- ❖ **Tabla 2.** Modificado de Ballesta A. et al (2020). Proceso de sustitución y adquisición de conducta de auto-consumo de alcohol. **Pág. 57.**
- ❖ **Tabla 3.** Anticuerpos primarios empleados para las pruebas de inmunohistoquímica. **Pág. 61.**
- ❖ **Tabla 4.** En esta tabla podemos observar los primers de los genes a medir por técnica de PCR para la realización del estudio. **Pág. 67.**

ANEXOS

- ❖ **Tabla 5. Anexo.** Interacción y efectos del consumo de alcohol (sacarina frente etanol) y tratamiento (vehículo frente fluoxetina) en los parámetros

ÍNDICE DE TABLAS E ILUSTRACIONES

morfométricos de las células microgliales que expresan el marcador IBA-1.

Pág.151.

I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. EL ALCOHOL EN LA HISTORIA

La recolección de alimentos, frutos, y otros alimentos de composición azucarada, y su posterior almacenaje y/o tratamiento para la conservación de los mismos, dio lugar a la droga más antigua existente en la cultura social del ser humano, el alcohol. Ya en la antigüedad, desde los griegos hasta la primera expansión del Imperio Romano, se consideró el consumo de alcohol como un acto social y cultural de gran aceptación. Productos como la cerveza o el vino, se convirtieron en símbolos de la gastronomía de diferentes pueblos y culturas.

Prueba de ello fue como el cristianismo, a diferencia de otras religiones como el budismo o el islam, lo comparaba con la “Sangre de Cristo”. No obstante, a pesar de los productos derivados de la fermentación, la cultura árabe permitió la adquisición de la destilación, obteniendo productos de mayor cantidad de alcohol y

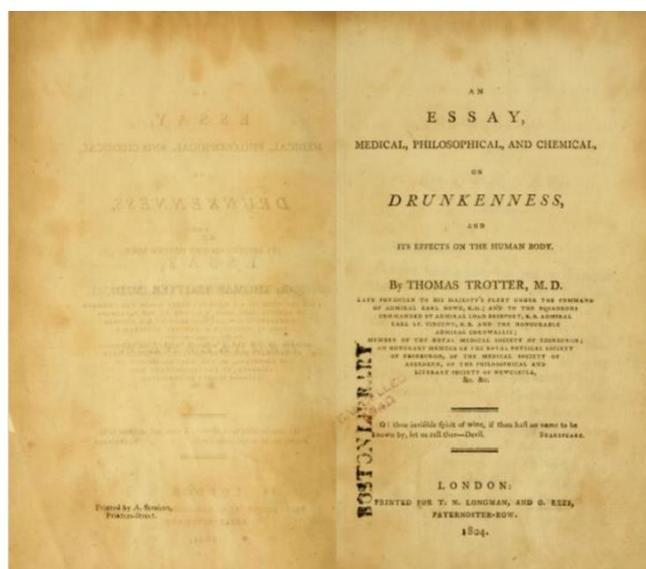


Ilustración 1 Extracto del manuscrito “An essay on Drunkenness” redactado por Thomas Trotter (1804). Extraído de la fuente: <https://archive.org/details/essaymedicalphil00trot/page/n7/mode/>

efectos potenciados. Algunos sabios o alquimistas de esta era llegaron a denominarlo como el “elixir de la vida”, dando lugar con los años al denominado whiskey (“agua de la vida”) (1,2,3).

Durante siglos, el alcohol no fue considerado como un problema en el ser humano, hasta que a partir del S. XIX Thomas Trotter lo identificó como un lujo que, asociado a los estilos de vida de las clases altas de la aristocracia, basados en el sedentarismo y el exceso

INTRODUCCIÓN

de sustancias como el té, el tabaco y el opio, que formaban parte de las convenciones sociales establecidas, situaban a estas clases en clara desventaja frente a las clases trabajadoras u obreras, cuyo cansancio y hambre se podían tratar con alimento, dieta y medicamentos. Thomas Trotter defendió así su postura escribiendo el primer texto médico categorizando el alcoholismo como un problema médico: “*An essay on Drunkenness*” (4,5).

En el otro lado del mundo, Benjamin Rush identificó el gran problema que suponía el alcohol, ya no solo en determinadas clases sociales, sino como un problema de salud pública. Tal fue su papel, que fue el primer norteamericano en crear una campaña política contra el consumo del alcohol, como el folleto denominado “*An Enquiry into the Effects of Spiritous Liquors upon the Human Body, and Their Influence upon the Happiness of Society*”, o su conocido “*Moral and Physical Thermometer*” (donde asocia la imagen de un termómetro vinculando el agua y la cerveza con aspectos saludables y felicidad, y a las bebidas con mayor concentración de alcohol o “licores espirituosos” con el vicio, las enfermedades y castigos más graves, a medida que la graduación de alcohol aumenta) como parte de su campaña en contra del consumo de bebidas destiladas como el ron, el whiskey o la ginebra, denominada “*Ardent Spirits*”. Así fue, como la moral empezó a imperar en el continuo y ambiguo debate médico acerca del alcoholismo como un simple deseo o una enfermedad (5).

El consumo de alcohol y su repercusión social fue realmente relevante en todo el mundo. Los acontecimientos relacionados con la era industrial, los nuevos movimientos sociales de liberalismo, la lucha de las clases obreras (entre otros acontecimientos de relevancia histórica), sirvieron para que el consumo de sustancias adictivas, como el alcohol, se adquiriera como un comportamiento de equidad entre la sociedad.

INTRODUCCIÓN

El alcohol generó discrepancias sociales de diversa índole, incluso entre la clase política de países como España en pleno reformismo, al situar el consumo de esta sustancia como parte de los movimientos pertenecientes al liberalismo y las diferencias entre clases sociales (6).

Sin embargo, la postura del paradigma biomédico presente durante el S. XX y principios del S.XXI acerca de evitar la asociación entre el consumo de alcohol y la aparición de problemas y enfermedades de índole social relacionadas con el consumo de este (entre otras sustancias adictivas), no han permitido que, hasta principios del S.XXI, se le reconozca al alcohol, como una sustancia clave de consumo humano que atenta contra la salud pública (7,8).

2. EL CONSUMO DE ALCOHOL Y SU IMPACTO EN LA SALUD PÚBLICA

El alcohol constituye una de las sustancias psicoactivas de mayor consumo y relevancia para la salud pública mundial (9). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el consumo de alcohol es uno de los principales factores de riesgo con gran carga socioeconómica. En 2018, se calculó que el consumo nocivo de alcohol provoca unos 3 millones de muertes en el mundo, cerca del 6% de todas las defunciones. A su vez, actúa como factor causal de más de 200 enfermedades y trastornos mentales, además de problemas cardiovasculares, hepáticos e inflamatorios. A consecuencia de ello, cerca del 5'1% de la carga mundial de morbilidad y lesiones se le atribuye al consumo de alcohol. Además, las consecuencias de discapacidad y muerte se producen en edades mucho más tempranas. En la edad comprendida entre 20 y 39 años, alrededor del 14% de defunciones se atribuye al consumo de alcohol. Incluso se ha llegado a determinar relaciones causales entre el consumo de alcohol y la incidencia de enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, y ETS (Enfermedades de Transmisión Sexual), como el VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) (10).

INTRODUCCIÓN

La dependencia al alcohol, se acentúa cada vez más en edades tempranas, tal y como reafirma la Encuesta Escolar sobre Uso de Drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias (ESTUDES), revelando cifras cercanas al 80% de estudiantes entre 14 y 18 años que habían probado alguna vez el alcohol (11).

3. TOXICOLOGÍA DEL ALCOHOL

El alcohol es un compuesto orgánico constituido por una base de dos hidrocarburos en los que se sustituyen uno o más grupos hidroxilo por un número igual de átomos de hidrógeno. Los alcoholes se emplean en multitud de tareas y funciones, como disolventes en industria textil y alimentaria: el n-propanol como antiséptico o constitutivo de pastas dentífricas; el n-butanol, presente en lacas, barnices y disolventes de pinturas; el isobutanol empleado en revestimientos de superficies y productos de limpieza y perfumes (al igual que el alcohol bencílico); el metanol, presente en multitud de productos como disolventes, colorantes, jabones, entre otros productos de índole cotidiana; y, entre muchos otros, cabe destacar el etanol, materia prima de múltiples productos, tanto textiles como alimentarios, tanto en la aplicación de anticongelante, como aditivo alimentario. En la ingesta de alcohol etílico, este es absorbido a través del tracto intestinal hacia el hígado, donde se metaboliza un 90% del alcohol, mientras que el 10% restante se metaboliza por las vías respiratorias y urinarias. Una vez en el hígado, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) cataliza el alcohol en acetaldehído liberando el grupo OH y uniéndolo a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) para formar el NADH. Una vez obtenido el acetaldehído, este experimenta un proceso de oxidación por la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) obteniendo como resultado el acetato, el cual es incorporado en el ciclo de Krebs en forma de acetyl coenzima A o Acetyl CoA. Sin embargo, también encontramos dos sistemas de metabolización más en el hígado: el sistema microsomal de oxidación del etanol, el cual a través del citocromo P450 (CYP450), se expresa en su

INTRODUCCIÓN

forma CYP2E1 en condiciones de alto consumo de alcohol produciendo acetaldehído mediante NAD fosforilado y O_2 , que constituye aproximadamente un 8% del metabolismo del alcohol en el hígado; y a través de la peroxidación del alcohol en acetaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producida en los peroxisomas de los hepatocitos, que constituyen el 2% del metabolismo del alcohol en el hígado (12).

El acetaldehído es una sustancia cancerígena del grupo 2B según la clasificación de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC). Los síntomas de su ingesta engloban las náuseas, los vómitos, narcosis e insuficiencia respiratoria, entre otros. Su consumo crónico, equivalente al trastorno de alcoholismo crónico, produce pérdida de peso, anemia, delirio, alucinaciones visuales y auditivas, deterioro cognitivo y trastornos psiquiátricos (13).

En los últimos años, se ha demostrado la significativa asociación existente entre el consumo de alcohol y otras sustancias de carácter adictivo, como son el tabaco, la cocaína, el cannabis y la heroína, entre muchas otras, proporcionando un perfil de alta comorbilidad a las personas que consumen alcohol. Esta característica es común al perfil que podría caracterizar cualquier enfermedad crónica, como la diabetes o la hipertensión. Con respecto al consumo de alcohol, observamos la aparición de trastornos mentales o enfermedades como el trastorno de depresión mayor (“Major Depression Disorder” en inglés), el trastorno por consumo del alcohol (“Alcohol Use Disorder” o “AUD” en inglés), entre muchas otras patologías mentales de naturaleza depresiva (14,15,16).

El consumo indiscriminado de alcohol y de forma continuada produce en el organismo un continuo daño, fundamentalmente por estrés oxidativo, que desencadena en un complejo cuadro clínico denominado Trastorno por Uso de Alcohol (TUA).

INTRODUCCIÓN

3.1 TRASTORNO POR CONSUMO/USO DE ALCOHOL (TUA)

Tal y como vimos en apartados anteriores, la historia del alcohol nos ha mostrado como esta droga ha sido capaz de adaptarse a los diferentes cambios psicosociales de la humanidad. El alcohol, a día de hoy, es la droga que más se consume en los países desarrollados en el S.XXI y constituye uno de los problemas de abuso de sustancias más comunes en todo el mundo (14,17).

Existe evidencia acerca de la asociación entre el TUA y la desestabilización de determinados procesos físicos y motivacionales conducentes a fases de abstinencia con serias repercusiones fisiopatológicas, principalmente, divididas en dos categorías: la primera, activando vías del sistema de recompensa, que incitan a los individuos que consumen alcohol a incrementar la dosis y, por tanto, el consumo de dicha sustancia, como una actitud reforzante; la segunda, a través de la supresión de determinadas emociones derivadas de estados procedentes del estrés y/o la ansiedad, conducentes a un estado de relativa euforia y disforia, que potencian las emociones suprimidas al ir desapareciendo el efecto de dicha sustancia (18,19,20).

De hecho, investigaciones recientes intentan demostrar las incógnitas que acaecen a la asociación entre el consumo de drogas como el alcohol, y la aparición de trastornos mentales de naturaleza depresiva, como el Trastorno por Depresión Mayor, y estados de euforia y/o ansiedad; o enfermedades neuropsiquiátricas como la enfermedad de Alzheimer, la demencia, e incluso la esquizofrenia. Todos ellos derivados por un diagnóstico inicial como el TUA o como co-diagnóstico del mismo, sobre todo en bebedores abstinentes en tratamiento frente a esta adicción (14,21,22).

INTRODUCCIÓN

Al retomar la idea previa del consumo de alcohol, cada vez de forma más temprana entre jóvenes, es evidente que pueden existir alteraciones neuroanatómicas y neuroquímicas a corto y largo plazo en circuitos cerebrales relacionados con las adicciones, como el TUA.

El alcohol, como cualquier droga adictiva, ejerce efectos en diferentes mecanismos moleculares, receptores y estructuras claves en el Sistema Nervioso Central (SNC), como es la activación del denominado Sistema de Recompensa, o vía mesocorticolímbica dopaminérgica, eje clave en los procesos de adicción y dependencia (23,24).

4. EL SISTEMA DE RECOMPENSA EN LA ADICCIÓN (VÍA MESOCORTICOLÍMBICA DOPAMINÉRGICA)

El sistema de recompensa ejerce un rol esencial en el desarrollo y la conducta de la adicción debido a sus funciones de regulación de las sensaciones hedónicas o placenteras, el proceso de aprendizaje y de la memoria, en especial de estímulos determinados o concretamente contextualizados que suelen presentarse como desencadenantes, en la repetición de una acción o conducta. Este circuito neural comparte gran parte de estructuras del sistema límbico, que son origen y campos principales de proyección del sistema dopaminérgico mesotelencefálico, mientras que en el área tegmental ventral (ATV) residen sus somas neuronales.

La vía mesocorticolímbica dopaminérgica tiene un origen en el ATV, desde donde sus proyecciones se dirigen a diferentes áreas, como el núcleo Accumbens (NAc), la corteza prefrontal (CPF), el hipocampo (HC), la amígdala (Amy), el tubérculo olfatorio y el septum. El NAc, a su vez, proyecta hacia el pálido ventral, y éste al NAc, de forma retroalimentada.

El principal neurotransmisor, que cumple un papel fundamental en la comprensión de los diferentes efectos que ejercen las drogas en este circuito de recompensa, es la dopamina

INTRODUCCIÓN

(DA). Este neurotransmisor se encuentra en mayor medida en su principal área de producción, el ATV. El ATV libera dicho neurotransmisor al NAc, otra de las regiones más relevantes del sistema de recompensa en el proceso de adicción. Este conjunto de neuronas forma parte de los ganglios basales, y en especial el NAc, ejerce un papel fundamental en la sensación del placer, la risa, la adicción y el sistema de recompensa. Así pues, un exceso de exposición a la DA, por abuso o repetición de una conducta y/o sustancia, puede generar cambios en las estructuras mencionadas que hagan que se produzca el fenómeno denominado adicción. (23,24)

No obstante, a pesar de ser el NAc la principal diana de la exposición dopaminérgica secundaria al consumo de drogas, existen otras estructuras diana de estos circuitos neuronales, como el tubérculo olfatorio, el septum lateral y el HC, o regiones pertenecientes a áreas corticales del sistema límbico, como la CPF, la Orbitofrontal (COF), Cingulada Anterior (CCA) y Entorrinal (CE).

Los efectos producidos por las sustancias de abuso, una vez cronificado su consumo, genera cambios en los neurocircuitos del sistema de recompensa y, por tanto, en la neuroplasticidad y las funciones de las diferentes regiones que la componen, mediando así los acontecimientos de búsqueda de la sustancia y del deseo por la misma (<<craving>>; *término en inglés*) que caracterizan a la recaída en el consumo de la sustancia.

Así pues, una vez ejercido el efecto de las drogas sobre el NAc mediante el aumento de la DA, existe un efecto de refuerzo que hace de esta acción de consumo aún más perjudicial. En este caso, la formación de asociaciones memorizadas entre aspectos o circunstancias motivacionales y estímulos, como el consumo de drogas, se debe en gran medida a la Amígdala Basolateral (BLA). Esta región es responsable de asociar dichas

INTRODUCCIÓN

experiencias, convirtiéndolas en fases predictoras o predisponentes a realizar determinadas conductas.

Otra de las regiones clave en la comprensión del proceso de la adicción es la CPF. Concretamente, la CPF, en su región ventral, se estructura en dos regiones: la corteza Prelímbica (PrL) y la Infralímbica (IrL). La PrL contempla entre sus funciones un papel esencial en la regulación en la respuesta al estrés, como aquel generado por la sensación de *craving* que genera la búsqueda compulsiva de la sustancia. La CPF constituye una de las cortezas asociativas más relevantes del SNC debido a su interconexión con áreas tan determinantes del SNC como el sistema límbico. De hecho, las interconexiones bidireccionales entre las regiones del sistema límbico, como la BLA y el HC, con la PrL de la CPF, son claves en la comprensión del funcionamiento de los neurocircuitos implicados en la expresión del miedo condicional (25). Así pues, la BLA, encargada de formar asociaciones entre el consumo de una sustancia y el estímulo que dicho consumo genera, se encuentra interconectada con la CPF, una corteza asociativa encargada de la ejecución y el control de impulsos que, a su vez, se encuentra interconectada con diferentes regiones, como el HC, una región principal de los fenómenos de neuroplasticidad y neurogénesis encargada de la creación de recuerdos y memorias contextuales relacionadas con el consumo de sustancias (25,26).

A pesar de existir multitud de conexiones y regiones relevantes en los procesos de adicción, cabe destacar que una vez que el consumo crónico de una sustancia de abuso genera el *craving* en el sujeto adicto, como señal de una desregularización del funcionamiento normal de las regiones que constituyen el sistema de recompensa, la conducta compulsiva de búsqueda de la sustancia señala a una región de especial relevancia, el estriado dorsolateral (Str). Según Everitt y Robbins (27) dicha desregularización genera una disfunción de la CPF, y por tanto, de su capacidad

INTRODUCCIÓN

inhibidora de la búsqueda de la droga, quedando relevada por un control estriatal. Esta transición neuronal explica cómo el consumo controlado y voluntario de la sustancia se convierte en una compulsión que, a su vez, implica una transición del control por parte del estriado ventral, responsable del control conductual, hacia el Str, generando un hábito compulsivo.

4.1 REFUERZO POSITIVO Y REFUERZO NEGATIVO - RETROALIMENTACIÓN DE LA ADICCIÓN

En base a los cambios neurobiológicos ejercidos por el consumo de sustancias en el sistema de recompensa y el sistema límbico, dichas modificaciones se traducen en modificaciones del comportamiento. No obstante, el principal cambio generado en la conducta adictiva se basa en el reforzamiento de dicha conducta, y en la razón de la misma al convertirse de un consumo voluntario y conductual a una compulsión irracional.

En cuanto al reforzamiento de una adicción, son igual de indispensables los efectos reforzantes positivos como los negativos. De ahí que el sistema límbico no participe exclusivamente en las conductas operantes de refuerzo positivo a las drogas, sino también en las correspondientes al refuerzo negativo, o también denominado síndrome de abstinencia, desencadenado por la falta o ausencia de droga, y caracterizado por un estado de inquietud, disforia, ansiedad e irritabilidad, principalmente. Sin embargo, Robert & Koob (28) ya definió en 1997 que, en función de las circunstancias y acontecimientos del consumo de la droga, se podía producir una serie de neuroadaptaciones en el SNC, y más concretamente en dianas pertenecientes al sistema de recompensa en modelos animales de consumo de sustancias adictivas. En el caso del alcohol, una forma de estudiar el efecto reforzante del comportamiento de los animales consiste en proporcionar la sustancia alcohólica ad libitum, o mediante el uso de palanca, a través de una conducta aprendida por parte del animal, dando pie a la asociación entre un comportamiento aprendido y una

INTRODUCCIÓN

situación predictora hacia un acontecimiento placentero (28), produciéndose así el denominado refuerzo positivo. Sin embargo, una vez que el consumo de la sustancia se hace crónico, de forma compulsiva, y con la finalidad de no experimentar los efectos que produce la ausencia de la misma en el organismo (dando lugar a un cuadro de abstinencia caracterizado por ansiedad, irritabilidad, astenia y temblores, entre otros síntomas), el individuo lleva a cabo una búsqueda de la sustancia de manera compulsiva, dando lugar al refuerzo negativo, base de los modelos comportamentales de los trastornos por consumo de sustancias, como el TUA.

En resumen, el proceso de adicción consta de un circuito basado en: 1) una fase de atracción (“*Binge*” en inglés) donde las acciones orientadas al consumo agudo de alcohol se basan en comportamientos derivados de la voluntad del sujeto y la pérdida del autocontrol (refuerzo positivo), caracterizado por una potenciación de los receptores D1 dopaminérgicos y un aumento de la DA; 2) una fase de abstinencia (“*Withdrawal*”) en la que se experimenta una desmotivación del individuo con sintomatología de carácter depresivo, con niveles dopaminérgicos por debajo del umbral establecido, producido por el consumo de la droga (alcohol); 3) y la aparición de la sensación del deseo (“*Craving*” en inglés), donde el individuo recuerda en su memoria la sensación producida por el consumo de la droga y surge la necesidad por consumirla para evitar la sensación de ansiedad que le genera, producido por la acción de los receptores dopaminérgicos D2 (refuerzo negativo). Por último, en la fase de recaída (Relapse), el sujeto genera un trastorno de uso compulsivo de la droga sin voluntad y, de esta manera, comenzaría el circuito de retroalimentación propio del consumo de sustancias adictivas, como el alcohol (29).

4.2 OTROS NEUROTRANSMISORES/NEUROMODULADORES IMPLICADOS EN EL TUA

Las modificaciones comportamentales derivadas del consumo de sustancias como el alcohol se encuentran estrechamente relacionadas con los cambios neurobiológicos entre las diferentes conexiones del sistema de recompensa. Así pues, el ATV y la sustancia negra compacta (SNc), áreas principales de dicho sistema, producen principalmente DA, el neurotransmisor clave del funcionamiento de dicho sistema, y conectan con el NAc y el Str, respectivamente. A su vez, estas regiones se comunican con el HC, la Amy, la CPF, la COF y la corteza motora (CM) constituyendo las principales conexiones glutamatérgicas del sistema de recompensa. El consumo de sustancias adictivas, como el alcohol, genera un aumento de la DA en todo el circuito mencionado, un aumento que, traducido a un consumo agudo, genera unos síntomas propios del placer (refuerzo positivo) mientras que, cuando el consumo se cronifica, el SNC adquiere un umbral de niveles de DA característico de los cambios neurofisiológicos y neuroanatómicos que el consumo de sustancias conlleva, produciendo el hábito compulsivo por no experimentar los síntomas propios de la falta de sustancia que permite mantener los niveles dopaminérgicos altos. No obstante, es de destacar el papel que la CPF ejerce en la regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas, empleando una vía directa de activación de las mismas a través de proyecciones glutamatérgicas directas, y una vía inhibitoria indirecta instaurada por eferencias glutamatérgicas de la CPF hacia interneuronas GABAérgicas.

Los neurotransmisores glutamato (Glut) y GABA son los más afectados por el consumo de alcohol. El denominado ácido gama aminobutírico (GABA), es un neurotransmisor de función inhibitoria que se encuentra ampliamente distribuido por el SNC, al igual que el Glut. Se obtiene de la conversión del ácido glutámico mediante la enzima glutamato

INTRODUCCIÓN

descarboxilasa. Este neurotransmisor es fundamental en el estrés fisiológico, más concretamente en estados de ansiedad, miedo, sueño o adicciones. En este último aspecto, se conocen estudios recientes en fase de experimentación (30,31,32), que revelan el receptor GABA B como una posible diana terapéutica para el TUA, debido a su función de mediador en el sistema de recompensa (33).

Existe otro neurotransmisor de relevancia en el sistema de recompensa, el Glut (forma ionizada del ácido glutámico) que, junto al aspartato, son los principales neurotransmisores con función excitatoria del NAc y, junto a la vitamina B6, es el precursor del neurotransmisor GABA. Entre las funciones de este neurotransmisor encontramos los procesos relacionados con la memoria y el aprendizaje, y constituye una de las principales fuentes de energía del sistema inmune. El consumo de alcohol ejerce una acción directa en el bloqueo de la síntesis de Glut, impidiendo la función excitatoria de las vías glutamatérgicas en el sistema mesocorticolímbico y fomentando la inhibición del mismo a través de las vías GABAérgicas. No obstante, una vez cronificado el consumo de alcohol, la actividad inhibitoria GABAérgica es menor debido a la muerte neuronal hipocampal y del ATV, y se produce un aumento de la actividad excitadora glutamatérgica en el núcleo central de la Amy (34,35).

4.3 LA SEROTONINA EN EL TUA

Es importante destacar que el estudio de las distintas dianas terapéuticas en adicciones ha dado lugar a hipótesis derivadas de la desregularización de los sistemas monoaminérgicos cerebrales, involucrados en el estado de ánimo como la ansiedad y la depresión, comunes a los circuitos de neurotransmisores principales del sistema de recompensa. Una de las primeras investigaciones en destacar este aspecto fue de Carrol & cols. (36) al emplear inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (ISRS) en modelos experimentales de cocaino-dependencia en ratas, cuyos dispares resultados al

INTRODUCCIÓN

compararlos con humanos demostraban las posibles implicaciones neuropsicotóxicas que podían producir las drogas en otros sistemas relacionados con el sistema de recompensa.

Muchos pacientes con TUA y animales sometidos a modelos de alcoholismo han experimentado sintomatología similar a la de un estado depresivo, sin embargo, la posible relación entre estas dos problemáticas de salud sigue siendo una incertidumbre. No obstante, la presencia de alcohol en el organismo, más concretamente en el SNC, desregulariza la señalización de ciertos sistemas monoaminérgicos, como la serotonina, un neurotransmisor involucrado en ciertos procesos asociados a la adicción, como la búsqueda de recompensa, la ansiedad y la recaída. La serotonina, también conocida como 5-Hydroxytryptamina (5-HT) y su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) han sido objeto de estudio al verse reducidos sus niveles en seres humanos y animales expuestos a consumo de alcohol, al igual que unos niveles mayores de estos dos elementos atenuaban el consumo de alcohol. Además, los niveles de 5-HT y de su precursor, el triptófano, se ven disminuidos en los niveles de sangre de pacientes con síntomas de depresión y en pacientes sanos que acababan de beber alcohol (37,38).

La serotonina media la comunicación celular del SNC y se ve afectada por el consumo de alcohol, puesto que su consumo induce un aumento de la liberación de 5-HT en el NAc al sensibilizar el sistema de receptores serotoninérgicos 5-HT₃ y 5-HT_{1a}. Sin embargo, en procesos crónicos de consumo como el TUA se produce una neuroadaptación por parte de los receptores 5-HT_{2a} induciendo a un cuadro ansioso y de menor control de la abstinencia, precedente al acto compulsivo de búsqueda por la sustancia (39,40).

De acuerdo a lo descrito anteriormente, el consumo de alcohol produce un efecto dosis-dependiente en las neuronas dopaminérgicas del ATV y de la liberación del neurotransmisor DA en el NAc. La liberación de DA dependiente de las

INTRODUCCIÓN

neuroadaptaciones generadas en los receptores serotoninérgicos 5-HT₃ y 5-HT_{2a} (41), y los estudios que señalan cómo los antagonistas de los receptores serotoninérgicos administrados en ratas consumidoras de alcohol bloquean la liberación de DA inducida por el consumo de alcohol en la Amígdala central (ACe) (la región más sensible al neurotransmisor GABA), señalan a la 5-HT como una monoamina con funciones clave para la comprensión de los fenómenos producidos en los neurotransmisores Glut, GABA y DA generados por el consumo de alcohol, concretamente en trastornos como el TUA.

5. TERAPIAS FARMACOLÓGICAS PARA EL TUA

El margen de acción en cuanto al TUA comprende un paradigma terapéutico multifactorial basado en orientación profesional especializada y, principalmente, en el inicio de terapias conductuales (Terapia cognitivo conductual; Terapia de estímulo motivacional, etc) y farmacológicas.

De acuerdo al ciclo de la adicción comentado en apartados anteriores (Ver apartado 4.1 “Refuerzo positivo y refuerzo negativo – Retroalimentación de la adicción”), la fase de abstinencia es una de las más relevantes en cuanto al tratamiento del TUA. Así pues, un factor relevante en el tratamiento de sujetos que se encuentran en fase de abstinencia es el estrés. Por ejemplo, el estrés generado por la fase de deseo por el consumo de la sustancia. La prazosina, un fármaco simpaticolítico, ha resultado de gran eficacia en sujetos que se encuentran en dicha fase (42). Un aspecto clave en la fase de deseo por el consumo de la sustancia reside en las experiencias subjetivas del sujeto, cuyas creencias y pensamientos previos generados por la perspectiva con la que observan los acontecimientos, incrementan esa sensación de deseo por el consumo de alcohol, fortaleciendo así el refuerzo negativo del ciclo de la adicción para reducir el estrés o la ansiedad generada por factores extrínsecos al individuo. En base a este aspecto, la gabapentina, la pregabalina y el acamprosato han resultado realmente efectivos

INTRODUCCIÓN

reduciendo la sensación de malestar derivado por la subjetividad de los sujetos con TUA e, incluso, mejorando la calidad del sueño de estos (43,44,45). En el caso del acamprosato, se ha comprobado su efectividad en el mantenimiento de la abstinencia en pacientes con TUA, actuando como antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), un tipo de receptores del Glut presente en la sinapsis neuronal, reduciendo la actividad glutamatérgica (46). Otra diana terapéutica es la modulación de los receptores α -amino-3-hidroxi-5metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), un receptor para Glut que media la transmisión sináptica. A este respecto, el topiramato (fármaco antiepiléptico) ha demostrado reducir el consumo de alcohol en pacientes con TUA, señalando la vía de receptores AMPA como una estrategia de demodulación del estrés homeostático neuronal. Sin embargo, la aparición de efectos adversos en la memoria y la concentración no lo sitúan como uno de los principales tratamientos para el TUA (47,48).

También encontramos los tratamientos pexacerfont y verucerfont, fármacos antagonistas del receptor del factor de liberación de corticotropina (CRF) (clave en áreas como la ACe), estrechamente relacionado con los estados de ansiedad y respuestas aversivas resultantes de la etapa inicial de la abstinencia alcohólica. Estos fármacos demostraron en modelos animales una disminución significativa en el autoconsumo de alcohol (49)(50), sin embargo, los resultados obtenidos en modelos animales no fueron los resultantes al aplicarlos en humanos (51,52).

Uno de los aspectos clave en el TUA es la desregularización del sistema mesocorticolímbico dopaminérgico, involucrado en las acciones relacionadas con el impulso de beber que produce el consumo de alcohol. Pero también es de destacar el sistema opioide, el cual también experimenta cambios por el consumo de alcohol, y desempeña un papel fundamental en la asociación de comportamientos y las experiencias hedónicas producidas por el consumo de alcohol, fomentado el fenómeno del refuerzo

INTRODUCCIÓN

hacia el consumo de la sustancia. Una de las dianas terapéuticas existentes son los agonistas parciales de receptores opioides, como la buprenorfina y la vareniclina. No obstante, en el caso de la buprenorfina, su efecto es bloqueado por la exposición previa a la naltrexona (ISRS) aumentando la ingesta de alcohol, mientras que reduce el consumo de alcohol en altas dosis, si no se expone a antagonistas selectivos de receptores nociceptivos, señalándolos como una posible línea terapéutica a desarrollar en TUA (53). En el caso de la vareniclina, un fármaco empleado para dejar el hábito tabáquico, ha demostrado ser de gran utilidad en el tratamiento del TUA, reduciendo el consumo y la intensidad del deseo relacionado con la fase del impulso por consumir el alcohol (*craving*), clave en las fases de abstinencia (*withdrawal*) (54).

5.1 EL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE Y OTRAS DIANAS TERAPÉUTICAS EN EL TUA

El factor estrés es determinante en las fases de abstinencia aguda y prolongada en el TUA, común al consumo de sustancias de abuso. Sin embargo, cabe destacar la existencia de sistemas determinados con capacidad de regular el estrés mediante la regulación de la homeostasis del SNC en el consumo de alcohol.

El sistema endocannabinoide (SEC), principalmente los receptores CB1 (localizado en el SNC y distintos tejidos periféricos) y CB2 (principalmente localizado en células del sistema inmune), desarrollan un papel determinante en la modulación de los transmisores excitatorios e inhibitorios en las neuronas dopaminérgicas del sistema de recompensa, actuando como mensajeros retrógrados en la sinapsis neuronal. Se ha asociado la aparición de síntomas depresivos con una disminución de la activación del SEC. En base a ello, el empleo de antidepresivos clásicos, como los ISRS tipo fluoxetina, disminuiría la expresión génica del receptor CB1 en áreas determinantes del sistema de recompensa, como el Str (55,56).

INTRODUCCIÓN

El consumo de alcohol disminuye la expresión de receptores CB1 y CB2, y se ven incrementados los niveles de ciertos cannabinoides endógenos como la anandamida (AEA) y la oleoiletanolamida (OEA) (57). La activación de CB2 promueve, entre otras funciones, modular las funciones neuroinmunes de la microglía y los astrocitos (58,59). La activación selectiva de CB1 y CB2 podría ser útil como posibles dianas terapéuticas en trastornos adictivos como el TUA. Por ejemplo, Rivera y cols. (60) mediante el agonista selectivo JWH133 mostraba que la activación de los receptores CB2 contrarrestaba los efectos tóxicos del consumo forzado de alcohol sobre la proliferación de células progenitoras neurales en nichos neurogénicos de ratas adultas como la zona subgranular (SGZ) del giro dentado y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (61,62).

Estas premisas sitúan a los endocannabinoides como una diana terapéutica potencial frente al TUA en fases de abstinencia al amortiguar la activación del estrés asociado a la abstinencia y que el comportamiento compulsivo de la búsqueda de sustancias adictivas se ve atenuado al reducir la eliminación de endocannabinoides (63).

Otro de los sistemas clave antiestrés es el neuropéptido Y (NPY), con efectos ansiolíticos y presente en diferentes regiones cerebrales, que actúa entre otras regiones en la ACe, un área relevante en el estado motivacional de estrés producido por el refuerzo negativo derivado del consumo de drogas, como el alcohol. De acuerdo a lo descrito, el NPY podría actuar como un sistema de regulación homeostático frente al estrés en el SNC (64,65).

Otro regulador ansiogénico es la nociceptina u orfanina FQ, un ligando endógeno del receptor opioide-1 (NOP), que atenúa la respuesta al estrés generado por consumo de sustancias como el alcohol, y ha demostrado obtener amplios resultados ansiolíticos en diferentes modelos animales de TUA (53,66). Cabe destacar como nuevos estudios sitúan a la oxitocina como una terapia potencial por su papel como modulador de la

INTRODUCCIÓN

susceptibilidad de desarrollar dependencia en sujetos consumidores de drogas adictivas, al inhibir el desarrollo de la tolerancia al consumo. De hecho, en sujetos humanos demostró una reducción del estado ansioso derivado de la abstinencia alcohólica en sujetos con TUA que consumían la sustancia como respuesta a condicionamientos sociales (67,68).

5.2 FARMACOTERAPIA DEL TUA Y SINTOMATOLOGÍA DEPRESIVA

El consumo de alcohol se asocia a la aparición de síntomas depresivos en seres humanos, a la par que aparecen síntomas de cierta similitud en animales expuestos a un consumo de alcohol crónico (37,69,70). A su vez, padecer depresión se asocia a una mayor predisposición de consumo de alcohol, y muchos pacientes con TUA padecían previamente síntomas de naturaleza depresiva, creando así un ciclo retroalimentado de comorbilidad (38,71,72).

En las últimas décadas, los fármacos antidepresivos y ansiolíticos han sido empleados en torno al 30-40% de la población con TUA (73). A su vez, según Coupland y cols. (74), el tipo de antidepresivos más empleados en este tipo de trastornos son los denominados ISRS, como el citalopram, la fluoxetina, la sertralina, la paroxetina y el escitalopram (Ver *Ilustración 2*). A su vez, también encontramos los antidepresivos tricíclicos, como la amitriptilina, la dosulepina y la lofepramina. Además, encontramos antidepresivos como la venlafaxina (ISRS) y la noradrenalina, o la mirtazapina, un antidepresivo noradrenérgico y serotoninérgico específico (74,75,76).

INTRODUCCIÓN

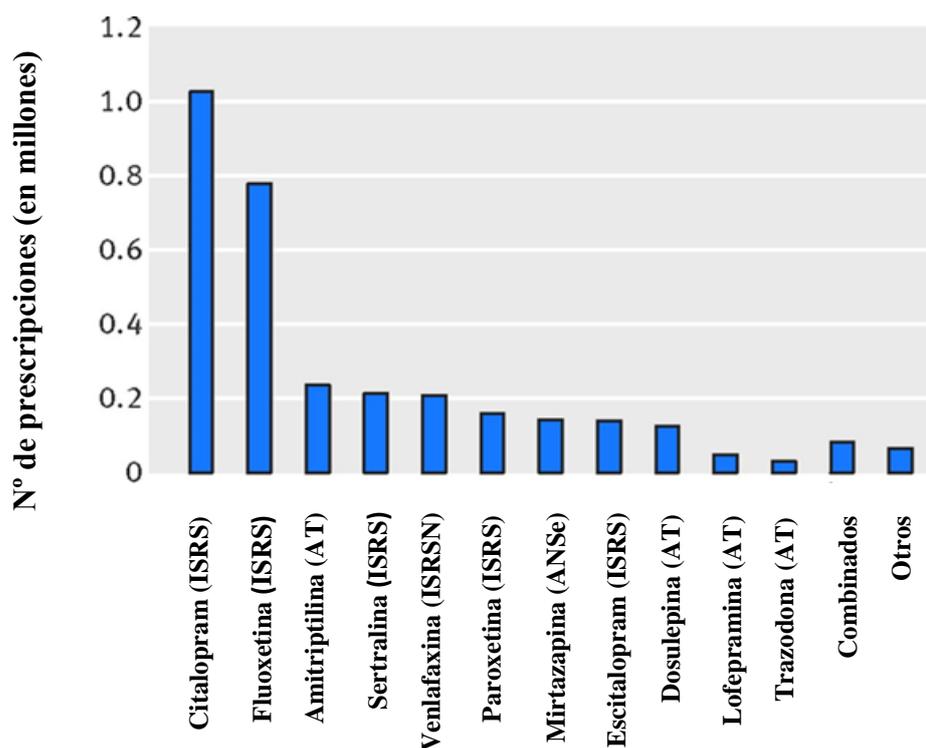


Ilustración 2 Gráfico extraído de la fuente: Coupland C, Hill T, Morriss R, Arthur A, Moore M, Hippisley-Cox J. Antidepressant use and risk of suicide and attempted suicide or self harm in people aged 20 to 64: cohort study using a primary care database. BMJ. 2015 Feb 18;350:h517. doi: 10.1136/bmj.h517. PMID: 25693810; PMCID: PMC4353276. En esta ilustración podemos observar la tendencia de prescripción de los diferentes antidepresivos más empleados en el año 2016, donde la Fluoxetina se encuentra como 2ª opción terapéutica más prescrita.

Los antidepresivos cíclicos han sido muy utilizados en el pasado, no obstante, los efectos secundarios que estos producen en su administración, como somnolencia, visión borrosa, caída de la tensión arterial, temblores, problemas sexuales de lívido, pérdida de peso, y aumento del apetito, y como consecuencia, aumento de peso, entre otros; los sitúan en un escalón de menor prioridad a la hora de tratar un trastorno depresivo. Otros tipos de antidepresivos, con un perfil de seguridad más alto, son los ISRS. No obstante, el mecanismo de acción sobre el que se sustenta la mayoría de ellos se basa en aumentar las concentraciones extracelulares del neurotransmisor serotonina y, por tanto, aumentando la neurotransmisión de este. Uno de los posibles efectos secundarios que se dan debido a altas dosis de este neurotransmisor es el denominado Síndrome de la serotonina, caracterizado por un cuadro sintomático de ansiedad, sudoración, falta de coordinación, fiebre, confusión, y alteraciones de la frecuencia cardiaca y la presión arterial. (75)

INTRODUCCIÓN

Respecto al uso de ISRS en el TUA, estos mejoran los síntomas de la abstinencia alcohólica (76,77,78) y, más concretamente, la fluoxetina reduce los síntomas de hiperactividad, ansiedad y depresión locomotoras inducidas por la abstinencia (76). No obstante, existen datos contradictorios acerca de la idoneidad de este tratamiento en pacientes con trastorno depresivo recurrente y TUA (79).

El consumo de alcohol genera un proceso inflamatorio en el SNC, un aspecto muy relevante debido a la sobreexpresión de factores proinflamatorios en pacientes con trastorno depresivo. Este nexo común en ambas patologías (la inflamación), nos hace cuestionarnos la posible interconexión existente entre el sistema inmune y las funciones del SNC, situando el proceso inflamatorio como componente clave en la comprensión de procesos y cambios cerebrales, por tanto, en la neuroplasticidad del cerebro en procesos adictivos. Las células microgliales, que corresponden al sistema inmune innato del SNC, son las encargadas de, entre otras funciones, generar una respuesta inmune frente a un daño producido en el cerebro. La alta tasa de prescripción de antidepresivos en pacientes con problemas depresivos derivados por el consumo de alcohol, principalmente ISRS, nos hace plantearnos cómo puede afectar a dicho sistema inmune en el cerebro, y a su vez, al proceso inflamatorio producido por patologías como el TUA y la depresión derivada por consumo de sustancias. No obstante, cabe destacar que las condiciones medioambientales pueden ser clave a la hora de comprender los diferentes efectos que generan los antidepresivos en los procesos neuroinflamatorios, como consecuencia de la lábil actividad de las células microgliales ante leves modificaciones del entorno que las rodea, como puede suponer el cambio de una situación de estrés leve a una situación de estrés crónico (80,81,82).

En base a este supuesto, existen dos aspectos de especial relevancia en el tratamiento del TUA con fluoxetina: en primer lugar, en pacientes con trastorno depresivo y TUA, los

INTRODUCCIÓN

ISRS no son más efectivos que los Inhibidores mixtos de la captación de Serotonina y noradrenalina (ISRN), como la nortriptilina (83); y en segundo lugar, el cese de la administración de fluoxetina tras un periodo de abstinencia alcohólica promueve un aumento en la autoadministración de alcohol, promoviendo grandes cambios en las respuestas motivacionales producidas por el alcohol, derivados de la alteración en la transmisión de 5-HT en el periodo de abstinencia alcohólica (84). De acuerdo a estos hallazgos, el tratamiento de fluoxetina de forma crónica y/o la interrupción abrupta del tratamiento con ISRS facilita la recaída en el consumo de alcohol en pacientes con TUA y trastornos del estado del ánimo como la depresión (85).

6. SISTEMA INMUNE Y NEUROINFLAMACIÓN

El sistema neuroinmune ejerce un rol fundamental en la regulación de los procesos y comportamientos generados por el consumo y la adicción al alcohol. Este sistema, junto a los neurotransmisores y neuromoduladores presentes en el SNC, adquieren un papel crucial en el impacto que puede generar el consumo de alcohol sobre la función o disfunción del cerebro. Así pues, el sistema neuroinmune emplea una serie de factores neuroinflamatorios denominados citocinas y quimiocinas. Estos factores, expresados en neuronas y células de la glía, median la comunicación entre las neuronas y la glía e interactúan con los sistemas neuroendocrino y neuropéptido, además de regular procesos cerebrales como la neurogénesis y el desarrollo del SNC (86,87,88,89).

6.1 FACTORES INFLAMATORIOS EN LA RESPUESTA INMUNE

Las citocinas son pequeñas proteínas de bajo peso molecular cuya función es clave en la comunicación y migración de las células inmunes. A su vez, las citocinas quimiotácticas (quimiocinas) tienen la capacidad de dirigir el movimiento de leucocitos circulantes hacia el lugar de inflamación o daño (90,91). Podemos clasificar cuatro grupos de quimiocinas en función de la ubicación de los residuos de cisteína (C) en el extremo N-terminal:

INTRODUCCIÓN

quimiocinas C, quimiocinas CC (dos cisteínas adyacentes), quimiocinas CXC y quimiocinas CX3C (donde encontramos de 1 a 3 aminoácidos entre las dos cisteínas). Las quimiocinas son moléculas solubles, y son producidas por neuronas y células microgliales en el SNC, a excepción de CX3CL1 que también la podemos encontrar en la membrana neuronal (92).

Los receptores de quimiocinas son proteínas de membrana acopladas a proteínas G. Un ejemplo de este receptor es CCR2, cuyo ligando es la quimiocina CCL2 o MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1; del inglés traducido: “*Proteína quimioatrayente de monocitos 1*”). Este receptor de quimiocina es clave en los procesos inflamatorios al regular la salida de monocitos de la médula ósea, a la par que regula el movimiento y la entrada de estos en tejidos como el SNC, dando lugar a la neuroinflamación (93,94,95).

Las citocinas y quimiocinas, como por ejemplo las quimiocinas CCL2 o MCP-1 y CXCL12, cuya unión con sus receptores específicos desencadenan una gran variedad de mecanismos, regulan la liberación de Glut, GABA y DA (96,97); o la liberación de Glut en los astrocitos tras la unión de la quimiocina CXCL12 o SDF-1 (Stromal cell-derived Factor-1; del inglés traducido: “Factor 1 derivado de células estromales”) con su receptor CXCR4 (98).

Esta serie de factores son regulados, en parte, por un componente clave en el sistema neuroinmune, la microglía, encargada de detectar los cambios que se producen en el entorno del SNC y, entre otras funciones, del desarrollo postnatal y la neuroplasticidad (99,100). Todo ello hace evidente que la comunicación bidireccional entre las neuronas y la microglía es clave para la comprensión del papel que ejerce el sistema neuroinmune en las funciones sinápticas a través de mecanismos presinápticos, postsinápticos y entre las neuronas y la glía. Esta señalización, por tanto, es clave a la hora de entender los

INTRODUCCIÓN

cambios que pueden ejercer las drogas, como el alcohol, en el SNC y, por tanto, en el sistema neuroinmune del cerebro.

El consumo de alcohol genera un medio tóxico y daño neuronal, una agresión que, al ser detectada por la microglía, ésta libera una serie de factores neuroinmunes con efectos neurotóxicos a la par que neuroprotectores (101). Las primeras citocinas, con función neuroprotectora, que libera la microglía ante la presencia de un daño o agresión, son el Factor Necrótico Tisular α (TNF α) y la Interleuquina 1 β (IL1 β). Sin embargo, cuando la microglía se encuentra en un estado de hiperactivación se liberan citocinas proinflamatorias, quimiocinas y diferentes especies reactivas de oxígeno (como el peróxido de hidrógeno, el radical superóxido o el radical hidroxilo), promoviendo un medio de neuroinflamación en las diferentes regiones afectas del SNC ante dicho agente dañino. No obstante, para contrarrestar dicho proceso, el cerebro produce factores antiinflamatorios, como la Interleuquina-10 (IL-10) o el Factor de Crecimiento Transformante B1 (TGFB1).

Estudios en modelos animales y con muestras de cerebros alcohólicos humanos han demostrado que el consumo de alcohol genera cambios significativos en el sistema neuroinmune (102,103). Por ejemplo, Qin & cols. (104) revelaron en un modelo de consumo excesivo de alcohol (denominado en inglés “*Binge Drinking*”) en ratones, cómo aumentaban los valores de quimiocina CCL2/MCP-1 y TNF α a la par que disminuían los de la citocina IL-10. Por tanto, queda evidente que el alcohol produce modificaciones genotípicas y fenotípicas en el sistema inmune innato. Sin embargo, aún no está clara la hipótesis de que la alteración del sistema neuroinmune contribuya a la dependencia del alcohol. Se sabe que la interrupción en la expresión de genes como el correspondiente a TLR4 (Receptor de Reconocimiento de Patrones tipo 4) en la Amy, reduce el consumo de alcohol (105). Además, modelos de “*Binge Drinking*” y exposición crónica al alcohol

INTRODUCCIÓN

promueven la activación del sistema neuroinmune a través de TLR y HMGB1 (106,107). Por ejemplo, Lecclerq y cols. (108,109) vislumbraron que el deseo por consumir alcohol se correlacionaba positivamente con el aumento de citocinas inflamatorias y, por tanto, que la activación de la señalización inmune innata aumentaba el deseo y el consumo de esta sustancia en humanos.

6.2 TLRs Y NEUROINFLAMACIÓN MEDIADA POR EL SISTEMA NEUROINMUNE

Los TLR son reguladores clave de la activación inmunitaria en el SNC en respuesta al alcohol y tienen funciones bien establecidas en la detección de patógenos y el inicio de la inmunidad innata y adaptativa durante la infección. No obstante, numerosos estudios demuestran cómo ligeras modificaciones de las diferentes vías involucradas por el TLR4 pueden variar el comportamiento del sistema inmune en función del modelo animal o humano (Ver tabla 1; adaptada de: Neuroimmune Pathways in Alcohol Consumption: Evidence from Behavioral and Genetic Studies in Rodents and Humans) (110).

INTRODUCCION

TABLA 1 Distintos Modelos de exposición a alcohol generan una respuesta inflamatoria específica en función de la especie de estudio. Adaptada de la fuente: Robinson G, Most D, Ferguson LB, Mayfield J, Harris RA, Blednov YA. Neuroimmune pathways in alcohol consumption: evidence from behavioral and genetic studies in rodents and humans. *Int Rev Neurobiol.* 2014;118:13-39. doi: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00002-6.

	ARNm Incrementado	Proteínas Incrementadas	Tipo de Célula Activada
Cultivos Celulares			
<i>Macrófagos</i>		TNF- α , IL1 β , NO, iNOS, NF-KB p65, COX-2 a	
<i>Cultivos Microgliales Primarios</i>		TNF- α , IL1 β , NO, iNOS, NF-KB p65, COX-2 b	Activación Microglial b
<i>Cultivos de Astrocitos Primarios</i>		MyD88, iNOS, COX-2 c	
Cortes Cerebrales			
<i>Rata</i>	TNF- α , IL1 β , MCP-1/CCL2, iNOS d	NF-kB (unido a ADN) d; HMGB1, IL1 β e	
Consumo de Alcohol Crónico			
<i>Ratón</i>	MCP-1/CCL2, IL1 β , TNF- α , TLR4, HMGB1 f; TLR2, TLR9, RAGE, componentes del inflamasoma g	CD14, TNF- α , IL1 β , NF-KB p65, iNOS, COX-2 c; MCP-1/CCL2, phospho-HMGB1, acetyl-HMGB1 g	Microglia, GFAP, Astrocitos e,g
Consumo de Alcohol en Atracción ("Binge Drinking")			
<i>Ratón</i>	TLR2, TLR3, TLR4, HMGB1 e; MCP-1/CCL2, IL-6 h	TLR2, TLR3, TLR4, HMGB1 e	GFAP, Astrocitos h
<i>Rata</i>	COX-2 i	NF-kB (unido a ADN) i	Activación Microglial i
Cerebros Postmortem			
<i>Humano</i>	RAGE j	MCP-1/CCL2 k; RAGE j; IL1 β , TLR2, TLR3, TLR4, HMGB1 e	Microglia k

a [Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A & Guerri C. \(2008\).](#)

b [Fernandez-Lizarbe S, Pascual M & Guerri C. \(2009\).](#)

c [Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I & Guerri C. \(2010\).](#)

d [Zou J & Crews F. \(2010\).](#)

e [Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP & Zou J. \(2013\).](#)

f

g [Lippai D, Bala S, Petrasek J, Csak T, Levin I, Kurt-Jones EA & cols. \(2013\).](#)

h [Kane CJ, Phelan KD, Douglas JC, Wagoner G, Johnson JW, Xu J & cols. \(2014\).](#)

i [Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L & cols. \(2006\).](#)

j [Vetreno RP, Qin L & Crews FT. \(2013\).](#)

k [He J & Crews FT. \(2008\).](#)

INTRODUCCION

Una hipótesis planteada en varios estudios (104,111,112,113) sostiene que los lipopolisacáridos (LPS), unas endotoxinas residentes en las bacterias Gram negativas y ligando de TLR4, tienen una estrecha relación con la generación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias a nivel periférico y central, si bien los efectos de estos factores inflamatorios se mantienen durante un mayor período de tiempo a nivel central. En base a dicha hipótesis, el consumo de alcohol crónico afecta a las uniones de las células epiteliales del intestino, liberando toxinas bacterianas intestinales como el LPS al torrente sanguíneo, a través del cual se unirían a los receptores TLR4 en las células de Kupffer del hígado y células mononucleares de sangre periférica. Este suceso promovería una serie de señalizaciones culminando en la activación de NF- κ B (Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), entre otros factores, aumentando la transcripción de citocinas proinflamatorias y óxido nítrico (NO). Dichas citocinas y quimiocinas atravesarían la barrera hematoencefálica promoviendo un mayor consumo de alcohol que, a su vez, generaría una mayor producción de citocinas proinflamatorias a nivel central y, como consecuencia, un mayor consumo de alcohol en un circuito de retroalimentación positiva. No obstante, existe cierta incertidumbre acerca de la hipótesis que sustenta cómo los LPS pueden atravesar la barrera hematoencefálica, pero se sostiene que la activación de los receptores TLR4 a través de dicha vía pudiese liberar ligandos endógenos y citocinas proinflamatorias que fomentasen la señalización inflamatoria neuroinmune.

La familia de los TLR, en especial TLR2 y TLR4, son esenciales en la respuesta inmune innata y adaptativa, al reconocer patrones inespecíficos de las bacterias y virus, iniciando así un proceso inflamatorio para eliminarlos (114,115). Así la activación de la microglía, por ejemplo, mediante la unión de ligandos para TLR4, como los LPS, produce la activación de una vía de señalización dependiente de MyD88 (Proteína de diferenciación

INTRODUCCION

mieloide 88) que termina por la activación del factor de transcripción NF- κ B e inicia un proceso de producción de citocinas pro-inflamatorias (116,117).

A pesar de las discrepancias entre estudios con diferentes metodologías de exposición al consumo o administración de alcohol, es posible que los diferentes comportamientos que adquiere el sistema inmune en relación a la expresión de determinados factores inflamatorios se puedan asociar a los diferentes paradigmas de consumo de sustancias, en este caso el alcohol, y a cambios específicos de las diferentes regiones del cerebro.

7. EL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL SNC – LA MICROGLÍA

Como exponíamos en apartados anteriores, el consumo de alcohol crónico puede derivar en un daño neurotóxico que, como consecuencia, genere una serie de trastornos derivados por uso de alcohol o TUA. Dichos cambios, a su vez, se asocian con la pérdida de volumen de estructuras pertenecientes al sistema nervioso central, como el lóbulo frontal, la corteza cerebral, el hipotálamo, el HC o el cerebelo (118). A su vez, los cambios producidos en la expresión de genes y la activación de señalizaciones neuroinmunes generan modificaciones fenotípicas en las diferentes células estructurales de dichas áreas.

7.1 DEFINICIÓN Y ASPECTOS CLAVE

En el SNC encontramos neuronas y glía, también denominada neuroglia, la cual constituye el tejido de sostén y soporte neuronal. La neuroglia adquiere diferentes formas celulares, en función de su localización periférica: Células de Schwann en el sistema nervioso periférico y células satélite de los ganglios; o si pertenece al SNC: oligodendrocitos, astrocitos, células endimarias y microglía. Todos ellos residen su origen embrionario en el ectodermo, a excepción de la microglía, de origen mesenquimático y mesodérmico (119,120). La microglía o células microgliales

INTRODUCCION

corresponden a los macrófagos del SNC, y son los principales responsables de activar la respuesta inmune del SNC.

No fue hasta 1911, cuando Nicolás Achúcarro pudo distinguir los astrocitos de otras células que más adelante corresponderían a las células microgliales (121), y Pío del Río-Hortega, mediante la técnica de carbonato de plata, pudiese definirla “por su núcleo pequeño y oscuro envuelto por escaso protoplasma y sus extensiones torcidas y ramificadas, adornadas con espinas laterales” diferenciándola así de los oligodendrocitos (122,123,124,125,126).

7.2 ESTADOS FISIOLÓGICOS DE LA MICROGLÍA

Además de generar una respuesta durante el proceso inflamatorio en el SNC, los avances científicos nos han permitido vislumbrar más allá de los clásicos estados de quiescencia o reposo y el estado de actividad microglial. De hecho, el paradigma de la microglía ha experimentado cambios de concepto al respecto.

7.2.1 MICROGLÍA EN ESTADO DE REPOSO

Tradicionalmente, se pensaba que la microglía se encontraba en estado de reposo o quiescente hasta reconocer un estímulo dañino en el cerebro y se activara para llevar a cabo el inicio de la respuesta inmune (Ver *Ilustración 3*). Sin embargo, a día de hoy se sabe que estas células se encuentran en continuo contacto con el parénquima cerebral a través de sus prolongaciones o procesos celulares mediante movimientos de emisión y retracción, conectándose así con somas, dendritas, axones y otras estructuras neuronales (127,128).

INTRODUCCION

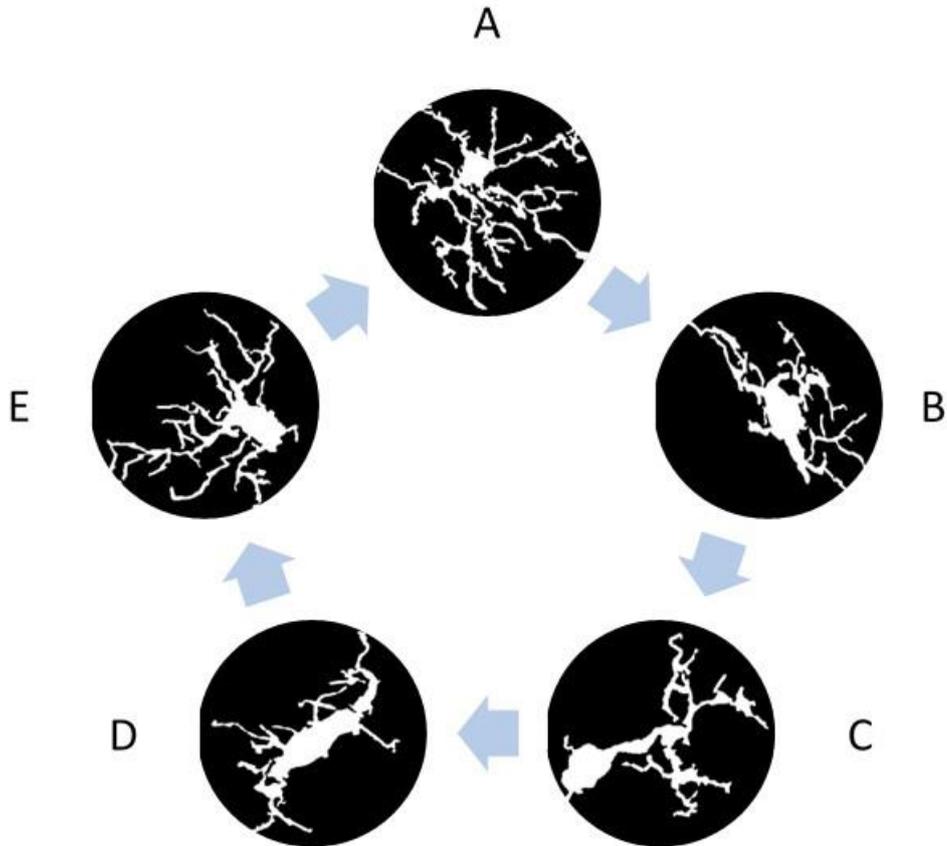


Ilustración 3. Imágenes pertenecientes al área de la CPF. En este esquema podemos observar la evolución que experimenta la disposición morfológica de la microglía desde un estado de reposo (Imagen A), un estado intermedio de activación (Imagen B y E) y un estado de activación (Imagen C y D).

Esta propiedad permite a la microglía llevar a cabo funciones en el desarrollo de conexiones neuronales o “*pruning*” (99), además de controlar, junto a los astrocitos, el acceso de determinadas moléculas a través de la barrera hematoencefálica (129) o la fagocitosis de células apoptóticas en el proceso de neurogénesis (130). Incluso es capaz de llevar a cabo la renovación de sus propias células y de otros componentes pertenecientes a las conexiones sinápticas, supervisando el estado funcional de la sinapsis neuronal (131,132).

Un parámetro clave a la hora de estudiar la microglía en reposo es la fractalquina o CX3CL1. Esta quimiocina se encuentra en altas dosis en la microglía, y las neuronas en estado normal son las encargadas de generar dicho ligando, cuyo receptor es CX3CR1. Cuando la fractalquina se encuentra presente en dosis normales, se podría traducir que

INTRODUCCION

hay un contexto de microglía en estado de vigilancia “no activado”. Sin embargo, en el momento que se produce un daño, las neuronas dejan de producir dicho ligando, una señal que induce a la activación de las células microgliales.

7.2.2 MICROGLÍA ACTIVADA O EN ESTADO PRO-INFLAMATORIO

Tradicionalmente, se han descrito dos estados de activación microglial en base a la función que desarrolla en el proceso inflamatorio desencadenante:

Microglía de fenotipo M1: este estado de activación pro-inflamatorio constituye la primera línea de defensa del sistema inmune innato, y su actividad puede generar daños neurotóxicos (133,134). En este estado de activación, existe una estrecha relación con los PAMPs (Pathogen-associated Molecular Patterns; traducido del inglés “*Patrones Moleculares Exógenos Asociados a Patógenos*”) ya que la exposición a LPS, entre otros, estimula a los TLR, como TLR4, llevando a cabo la activación de los factores de transcripción NF- κ B y STAT1 e iniciándose así la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL-6 IL-1 β , o la quimiocina CCL2/MCP-1 (135,136), entre otras citocinas y quimiocinas. A su vez, este estado de activación induce la activación de la respuesta inmune adaptativa mediante linfocitos T (137).

Microglía de fenotipo M2: este estado fisiológico ejerce una función neuroprotectora a través de la liberación de citocinas anti-inflamatorias mediante dos vías principales: una de ellas es la activación de STAT6 a través de la unión del ligando IL-4 con su receptor IL-4R, fomentando la adquisición de la morfología celular de un fenotipo anti-inflamatorio, y liberando citocinas del tipo IL-4 e IL-10; la otra vía transcurre por la estimulación de IL-10 a través de STAT3, fomentando la caracterización de las células hacia un fenotipo de tipo inmunosupresor primario que libera citocinas anti-inflamatorias IL-10 y TGF β (136).

INTRODUCCION

7.2.3 MICROGLÍA EN ESTADO ANTI-INFLAMATORIO

La microglía se define como el tejido macrófago tisular del SNC, encargado de activar y supervisar la respuesta inmune del cerebro. En un estado anti-inflamatorio microglial, la función principal de este macrófago es la fagocitosis, a través de la cual, se introduce material extracelular, se reconoce y se degrada, con la finalidad de regular la expresión de receptores de superficie, la presentación de antígenos en las membranas celulares participando en el inicio de la respuesta inmune adaptativa a través de Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II (MHC II), o eliminar células, como linfocitos T y neutrófilos en apoptosis, conduciendo a una reducción en la producción de citocinas pro-inflamatorias, entre otras funciones (129,138,139,140).

7.3 COMUNICACIÓN MICROGLIAL: RECEPTORES, CITOCINAS Y QUIMIOquinas

La microglía, como primera línea de defensa frente a un daño provocado por una toxina, virus o bacteria, emplea una amplia gama de receptores, entre los cuales cabe destacar los receptores de patrones moleculares o PRRs (del inglés “*Pattern Recognition Receptors*”), los cuales podemos clasificar en: TLR, los receptores similares a NOD (NOD-like receptors o NLR; NOD del inglés “*Nucleotide binding oligomerization domain*”; Dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) y Receptores similares a RIG-I (RIG-I-like receptors o RLR; RIG-I del inglés “*Retinoic acid-inducible gene-I*”; Gen I inducible por ácido retinoico). Así, estos receptores, además de reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, como los PAMPs, también reconocen patrones moleculares asociados a daños o DAMPs (Damage-associated molecular patterns; Del inglés “*Patrones Moleculares asociados a daños*”) (141).

La infiltración de estas moléculas pertenecientes al proceso de inflamación, se regula a través del control que ejercen los astrocitos en la barrera hematoencefálica, y las células

INTRODUCCION

gliales restantes. A su vez, los astrocitos también son una fuente de producción de citocinas (TNF α , IL-1 β , IL-6) y quimiocinas (CXCL10, CCL2) (142,143). Una vez se infiltran macrófagos y linfocitos en el tejido nervioso, tras la permeabilización de la barrera hematoencefálica como consecuencia de la activación del sistema inmune, estos favorecen el reclutamiento de más linfocitos hacia las regiones afectadas, promoviendo una respuesta inflamatoria y la liberación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias (144,145).

Sin embargo, la presencia de linfocitos T inmaduros en las zonas donde se produce la inflamación hace que se presenten en forma de Th1 (favoreciendo un medio proinflamatorio) y Th2 (generan un medio antiinflamatorio), en base al criterio modulador que ejerce la microglía en su fenotipo M1, y la diferenciación que ejercen los astrocitos hacia Th2 (146). No obstante, las características y las modificaciones ejercidas por las neuronas, las células gliales y la microglía son tan diversas y diferentes que hacen necesario una mayor comprensión del fenómeno inflamatorio, específicamente en base a las modificaciones fenotípicas y morfológicas de las células microgliales, responsables de la mediación de la respuesta del sistema inmune en el proceso inflamatorio.

8. ANÁLISIS DE FORMA EN LA CÉLULA MICROGLIAL

La morfología de la microglía ha sido clave en las últimas décadas para empezar a comprender las diferentes funciones y características del comportamiento del sistema inmune innato en el SNC.

El primero en describir este aspecto fue Pío del Río-Hortega (122,123,124,125,126), cuyas descripciones fueron pioneras en describir la distribución y caracterización de estas células, sobre todo en procesos patológicos en los que las ramificaciones comenzaban a desaparecer, adquiriendo la célula un aspecto ameboide. Así pues, tradicionalmente se

INTRODUCCION

han clasificado tres fenotipos diferentes (Ver *Ilustración 4*): 1) de aspecto compacto; 2) ramificadas longitudinalmente en forma de bastón y; 3) ramificadas radialmente, con forma de árbol (147).

El estado funcional de vigía o *Surveillant* es el correspondiente al fenotipo ramificado y, a partir de este estado, ante la percepción de un daño, adquiere unos procesos celulares de mayor grosor, más cortos y gruesos, además de un soma más grande y compacto, adquiriendo un “estado activado” (148). También la podemos encontrar en un estado reactivo, en el cual el soma se reduce de tamaño, y adquiere una forma redondeada o ameboide en forma de barra (149). En otros tipos de daño, como es la neuroinflamación, estas células disminuyen el número de ramificaciones. Existen estudios previos que han intentado describir morfológicamente las características fenotípicas de las células microgliales en función de algún daño o proceso patológico, como el estrés fisiológico (150) o el estrés psicológico (151). Sin embargo, a pesar de quedar clara la idea de que la microglía varía en función de la región del cerebro, tanto su fenotipo como la distribución, los cambios producidos en estas células pueden llegar a ser muy sutiles como para cuantificarlos con los métodos rutinarios de análisis, como el diámetro o el perímetro.

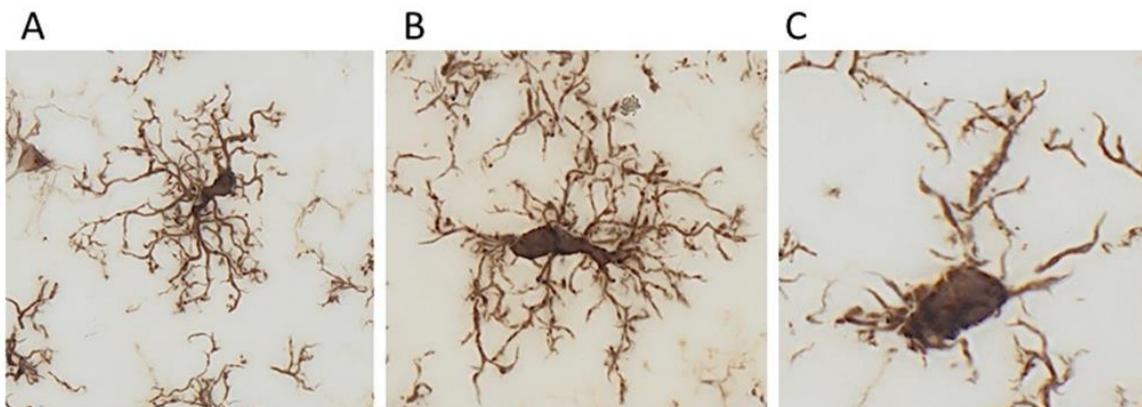


Ilustración 4 Imágenes correspondientes al área CA1 hipocampal. En dicha ilustración podemos observar un estado de microglía en forma de árbol, correspondiente a la imagen A; otra imagen B, donde el soma empieza a alargarse y sus procesos celulares comienzan a hacerse más gruesos y a concentrarse alrededor del soma; y, por último, una imagen C, donde observamos un soma muy concentrado, sin apenas ramificaciones y de forma ameboide.

INTRODUCCION

Una de las metodologías empleadas en el análisis morfológico de la microglía es el análisis Sholl (152) o “método de capa concéntrica”, basado en la superposición de círculos concéntricos sobre una imagen de una célula, tomando como punto central de referencia el soma celular, y cuantificando las intersecciones entre las prolongaciones o ramificaciones y los círculos establecidos. Este método ha sido empleado en estudios como el perteneciente a Yamada & Jinno (153) para contabilizar las ramificaciones de las células microgliales en un modelo experimental de daño neuronal por axotomía del nervio hipogloso. Otros autores, como Torres-Platas & cols. (154), han permitido establecer diferentes parámetros morfológicos de las células microgliales en cerebros humanos, a través de reconstrucciones tridimensionales de las células, mediante el delineamiento manual de las ramificaciones de las células en una imagen digital. E incluso se han llevado a cabo estudios de clasificación de grupos microgliales por su morfología, mediante el empleo de análisis estadístico de los datos cuantificables de parámetros morfométricos microgliales (155,156).

Otro tipo de análisis menos utilizado, aunque bastante revelador en la actualidad, es el análisis fractal. En la década de 1980, Benoit Mandelbrot restableció el diseño de conjuntos fractales, planteando el método matemático que estimase la complejidad de los objetos, dando lugar a la denominada *Dimensión Fractal*, un parámetro capaz de cuantificar el grado de irregularidad de los objetos o el grado de repetición de patrones que pueden aparecer a diferente escala en un objeto, lo que se denomina autosimilitud o autosemejanza (157,158). La Dimensión fractal (D) muestra objetivamente el grado de complejidad de un objeto, y cuanto más irregular sea, mayores valores adquiere la D . Este parámetro es muy útil, debido a su alta sensibilidad, pues ante la mínima variación de forma, su valor cambia (159). Un ejemplo de análisis empleado con esta metodología fue el estudio planteado por Goldberger & West (160) sobre la compleja estructuración del

INTRODUCCION

árbol bronquial; o la cuantificación de la complejidad en las ramificaciones de células de la glía, para la clasificación de diversos tipos morfológicos (161,162).

Otro parámetro de especial relevancia en el análisis de la morfología celular es la Lacunaridad (Λ), que define el grado de heterogeneidad o de varianza traslacional y rotacional de un objeto, a través del reconocimiento de espacios o huecos en la forma del objeto, permitiendo así describir su patrón morfológico y su dispersión espacial (163). Según Karperien & cols. (164) un mayor valor de Λ indica una mayor heterogeneidad del objeto. Este dato es útil, ya que en estudios llevados a cabo en procesos patológicos diferentes para la clasificación de subtipos de células microgliales, se daba el caso de células con un mismo valor de D , que diferían en cuanto al valor de Λ , indicando la lacunaridad como una herramienta distintiva a la par que complementaria de la Dimensión Fractal, pues permite distinguir los cambios sutiles que diferencian unas células de otras, pero que no son reconocidos por el parámetro D .

Uno de los trabajos más reveladores que emplean la metodología *Box counting* para la obtención y análisis de parámetros morfométricos de las células microgliales, es el empleado por Fernández-Arjona & cols. (165,166,167,168) permitiendo la clasificación de diferentes categorías de células microgliales en base a 15 parámetros morfométricos diferentes, y su correlación con la expresión de factores inflamatorios. Estos estudios han permitido una mayor aproximación a la categorización objetivable de morfotipos microgliales dependientes del carácter inflamatorio de la microglía, y la antesala a la incorporación de estas metodologías en la comprensión de los cambios ejercidos por el daño o proceso inflamatorio generado por el consumo de sustancias adictivas, como el alcohol, en la forma y el fenotipo de las células del sistema inmune innato del cerebro (169).

INTRODUCCION

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACION DE LA TESIS

El empleo de la fluoxetina (ISRS) se considera como tratamiento de elección en la terapia psicofarmacológica del paciente con TUA. Previamente, se han llevado a cabo diversos estudios preclínicos en nuestro grupo de investigación, demostrando los efectos nocivos que produce el cese abrupto del tratamiento de ISRS en modelos de autoconsumo de alcohol crónico con recaída. En la actualidad se están llevando a cabo terapias a través de ensayos, en los que se están evaluando a los receptores de quimiocinas como dianas terapéuticas en el tratamiento de diversas patologías de naturaleza inflamatoria (170) (171). No obstante, existe cierta incertidumbre acerca del rol que ejerce la microglía en estados de inflamación secundaria como respuesta a exposiciones prolongadas de alcohol que permiten desarrollar un TUA (104,169,172).

En base a los antecedentes expuestos, esta tesis doctoral pretende abordar la relación entre función y morfología microglial en un paradigma de interacción entre el consumo de alcohol y un tratamiento antidepresivo, a partir de la siguiente hipótesis.

1. HIPÓTESIS

- ❖ El tratamiento de los trastornos por uso de alcohol (TUA) con antidepresivos de naturaleza ISRS (Inhibidores Selectivos de la Recaptación de la Serotonina) ejerce cambios neuroinflamatorios (morfológicos y fenotípicos de las células gliales) en un modelo experimental de autoadministración de alcohol, cese de tratamiento tras abstinencia y posterior recaída alcohólica.

2. OBJETIVO GENERAL

- A. Analizar factores neuroinflamatorios (células microgliales que expresan citocinas y quimiocinas) en regiones cerebrales del sistema límbico (Corteza Prelímbica) y sistema de recompensa (Núcleo Estriado, Amígdala Basolateral y región CA1 del HC) de ratas con dependencia alcohólica (exposición y recaída) en un modelo de autoadministración de alcohol, y tratadas con fluoxetina (10 mg/kg) durante el período de abstinencia.
- B. Determinar el papel que ejercen las áreas de interés para el estudio (Corteza Prelímbica, Estriado, Amígdala Basolateral e Hipocampo-CA1) relacionadas con el sistema límbico y el sistema de recompensa en la caracterización morfológica y fisiológica de las células microgliales y su perfil inflamatorio en las etapas de autoconsumo, cese abrupto del tratamiento tras la abstinencia y recaída al autoconsumo de alcohol.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar cambios en el número de células y la intensidad de la inmunoreactividad de estas, que expresan el marcador Iba-1 específico de microglía en la corteza prefrontal, el estriado, la amígdala basolateral y el hipocampo (CA1), en sujetos con exposición repetida de alcohol y en sujetos con recaída al autoconsumo de alcohol tras un tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia.
- b) Determinar cambios en los niveles de expresión génica de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, entre otros factores relacionados con la neuroinflamación, en células microgliales del SNC en sujetos con recaída al autoconsumo de alcohol tras un tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia.
- c) Analizar los cambios morfológicos producidos en las células microgliales de las diferentes regiones cerebrales a causa de una exposición repetida de alcohol y una recaída al autoconsumo de alcohol tras un tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia.
- d) Evaluar si existe relación entre los cambios morfológicos y fenotípicos de las células microgliales en las diferentes regiones de estudio.

III. MATERIAL Y MÉTODO

MATERIAL Y MÉTODO

ASPECTOS ÉTICOS

Los experimentos realizados en este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid (PROEX: 077/16, título: "Impacto del uso de antidepresivos sobre el consumo de alcohol y cocaína: Efectos indeseados y mecanismos") y por el Comité de Ética e Investigación de la Universidad de Málaga (CEUMA: 84-2015-A). Los procedimientos de este experimento de llevaron a cabo conforme a la Directiva Europea 2010/63/UE sobre la protección de los animales para la experimentación científica y la normativa española (RD 53/2013 y 178/2004).

1. MODELO ANIMAL DE AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL

1.1 ANIMALES

Para realizar este experimento, se utilizaron ratas Wistar (n=38) machos adultos (10-12 semanas) con un peso de 250 g (CrI:WI, Charles Rivers, Barcelona, España), en base a la idoneidad de dicha especie para alcanzar los objetivos propuestos (173) y facilitados por el Dr. Alén Fariñas (Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento, Universidad Complutense, Madrid).

Los animales fueron estabulados a temperatura (23 ± 1 °C) y humedad ($40 \pm 5\%$) constantes, en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con acceso *ad-libitum* a comida (Prolab RMH 2500, 2.9 kcal/gr) y agua. Estas condiciones fueron mantenidas durante 2 semanas como período de habituación de los animales desde su llegada al estabulario.

Los animales fueron separados en grupos de 3-4 sujetos por jaula fabricadas en metacrilato transparente con rejillas metálicas nada más llegar al estabulario.

Tras el período de habituación, los animales fueron separados individualmente en jaulas de metacrilato hasta la finalización del experimento. Este experimento está basado en las

condiciones de aislamiento y su relación con la aparición de conductas de naturaleza depresiva en roedores ya descritas por Ballesta A. & cols. (22) y Suárez J. & cols. (174).

1.2 DISEÑO DEL EXPERIMENTO

El paradigma de auto-administración operante de alcohol en modelos animales de TUA ha resultado ser de gran calidad predictiva para conocer los mecanismos cognitivos y motivacionales generados en una conducta repetida asociada a la acción reforzante de una sustancia adictiva (22,84,174). A su vez, este paradigma permite esclarecer el impacto que ejerce el tratamiento farmacológico empleado en el TUA en relación a los cambios fisiológicos y bioquímicos acaecidos tanto por el consumo de dicha sustancia, como por el supuesto efecto que produce el tratamiento. Incluso, nos permite conocer los diferentes efectos que puede ocasionar el cese de dicho tratamiento y la recaída al consumo de dicha sustancia adictiva (78,173,175).

En nuestro caso, nuestro modelo animal se caracteriza por una fase de abstinencia alcohólica, en la que se les administró el tratamiento con Fluoxetina (ISRS – Inhibidor Selectivo de la Recaptación de la Serotonina) durante dos semanas. Previamente, estos animales fueron entrenados para adquirir la conducta reforzante de autoconsumo de alcohol basándonos en el paradigma de auto-administración operante mencionado anteriormente. Tras la fase de adquisición del autoconsumo y las dos semanas de tratamiento durante la fase de abstinencia, se procedió a una retirada no progresiva del tratamiento y a una re-exposición al autoconsumo de alcohol durante un período de tres semanas (Ver *Ilustración 5*). Una hora después de la última sesión de autoadministración de alcohol, se llevó a cabo el sacrificio y la extracción del material biológico procedente de los diferentes grupos experimentales para el estudio.

MATERIAL Y MÉTODO

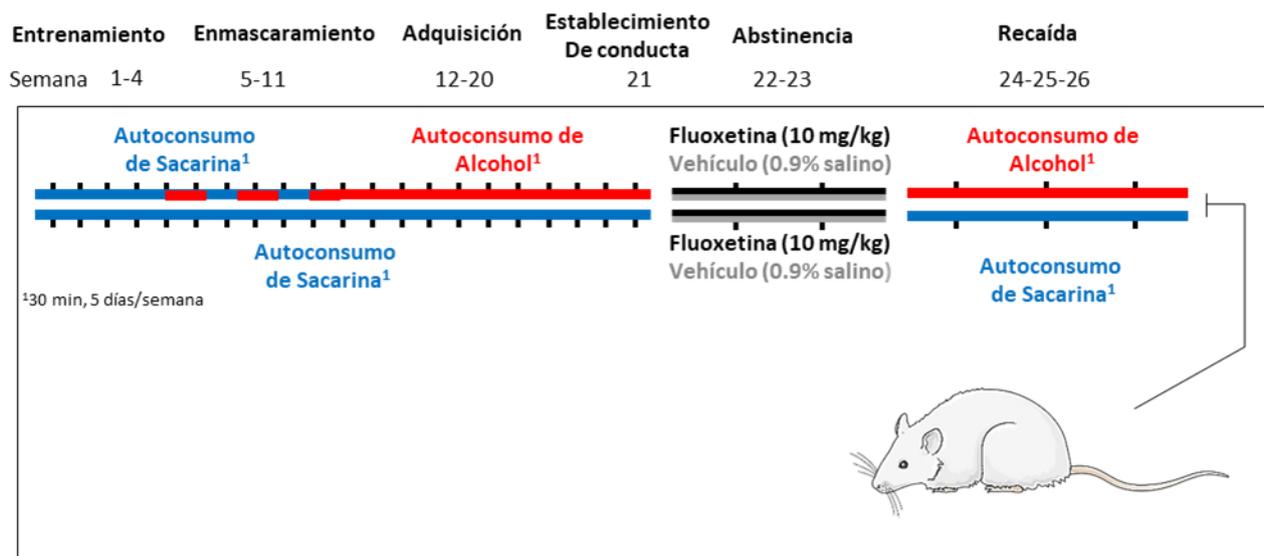


Ilustración 5 Imagen adaptada de la revista *BS&F*: Aranda J, Fernández-Arjona MDM, Alén F, Rivera P, Rubio L, Smith-Fernández I, Pavón FJ, Serrano A, Serrano-Castro PJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Sudden Cessation of fluoxetine before alcohol drinking reinstatement alters microglial morphology and TLR4/inflammatory neuroadaptation in the rat brain. *Brain Struct Funct.* 2021 Sept 3. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02321-9>. En este esquema podemos ver la representación esquemática ilustrada del diseño experimental llevado a cabo. Dicho experimento queda constituido por 4 grupos basados en dos factores: alcohol (un grupo expuesto a una dieta de sacarina como control y otro expuesto a una dieta alcohólica) y tratamiento (un grupo expuesto a vehículo, no tratado, y otro grupo tratado con fluoxetina).

1.3 AUTO-ADMINISTRACIÓN OPERANTE DE ALCOHOL

El experimento se llevó a cabo mediante el empleo de cajas de auto-administración operantes (Leticia, modelo LE 850; Panlab, Barcelona, España). Estas cajas presentan dos palancas retractiles, ubicadas por separado en la misma pared y donde la sustancia reforzante se ponía a disposición del animal. Una de las palancas, era la palanca activa, a través de la cual obtendría el sujeto el refuerzo o sustancia reforzante (en este caso, la sacarina y posteriormente el alcohol), y la otra sería la palanca inactiva, que no proporcionaría al animal ninguna sustancia. El animal, al presionar la palanca activa, disponía de 0,1ml de sacarina al 0,2% (Sigma-Aldrich, España) o de alcohol etílico (Alcoholes Aroca, España) al 10%, tras la cual, el animal no volvía a disponer de la

MATERIAL Y MÉTODO

sustancia reforzante al presionar de nuevo la palanca activa durante los siguientes 2,5 segundos.

Cada sesión de auto-administración tenía una duración de 30 minutos. Estas sesiones se realizaban de forma diaria durante 5 días a la semana, de lunes a viernes.

El procedimiento de auto-administración operante de alcohol consta de tres fases: fase de entrenamiento, fase de sustitución y fase de adquisición (Ver *Ilustración 5*). La fase de entrenamiento ocupa las cuatro primeras semanas (Semanas de la 1 a la 4) y consiste en que el animal adquiriera rápidamente un comportamiento de autoconsumo con sacarina al 0,2% como sustancia reforzante. Tras haber conseguido una conducta estable de auto-administración de la sustancia reforzante, de acuerdo a lo descrito previamente por Ballesta A. & Cols. (22), se continuó con la fase de sustitución. La fase de sustitución consiste en ir sustituyendo progresivamente la autoadministración de sacarina al 0,2% por la de alcohol al 10% (Semanas de la 5 a la 11). Se procedió a una exposición progresiva de alcohol en base a las concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10%, a partir de una solución de etanol al 99% p/v (Ver Tabla 2, extraída de Ballesta A. & Cols. (22)). La fase de adquisición ocupa las siguientes semanas de auto-administración (Semanas de la 12 a la 20) y se alcanza cuando el animal adquiere un comportamiento estable en el autoconsumo de alcohol al 10% (Ver *Ilustración 5*).

Una vez alcanzado el objetivo conductual del consumo de alcohol, se llevó a cabo una interrupción de 14 días en la auto-administración de alcohol (período de abstinencia), en la que se administró el tratamiento antidepresivo (ISRS) fluoxetina (Ver *Ilustración 5*).

MATERIAL Y MÉTODO

Tabla 2 Modificado de Ballesta A. et al (2020). Proceso de sustitución y adquisición de conducta de auto-consumo de alcohol

Período de tiempo (en sesiones)	Sustancia administrada
3 sesiones	Sacarina 0,2%
3 sesiones	Sacarina 0,16% + Etoh 2%
3 sesiones	Sacarina 0,12% + Etoh 4%
4 sesiones	Sacarina 0,08% + Etoh 6%
4 sesiones	Sacarina 0,04% + Etoh 8%
4 sesiones	Sacarina 0,02% + Etoh 10%
Resto de sesiones	Etoh 10%

1.4 TRATAMIENTO Y RECAÍDA AL AUTO-CONSUMO DE ALCOHOL

En la semana 22 y 23 del experimento, durante la fase de abstinencia alcohólica, se procedió a la administración del tratamiento farmacológico fluoxetina (Prozac®, Eli Lilly, Alcobendas, España). La solución de fluoxetina clorhidrato empleada para el experimento se preparaba diariamente disolviéndola en solución salina al 0,9%. Dicha solución se administraba intraperitonealmente en forma de inyección a los sujetos a una concentración de 10 mg/kg en un volumen de 2 ml/kg de peso corporal del animal. La administración del tratamiento era de una vez al día durante los 14 días de la fase de abstinencia alcohólica (Ver *Ilustración 5*).

Tras la fase de abstinencia alcohólica y tratamiento con fluoxetina, se continuó con una fase de reinstauración de la auto-administración de alcohol, correspondiente a la fase de recaída de consumo de alcohol (Semanas 24, 25 y 26). La fase de reinstauración o recaída alcohólica se produce tras el cese abrupto del tratamiento con fluoxetina (Ver *Ilustración 5*). En base a lo descrito, 24 horas después de la última sesión de administración del

MATERIAL Y MÉTODO

tratamiento antidepresivo, los animales se volvieron a exponer a la autoadministración operante del consumo de alcohol con una solución a concentración del 10% de Etoh, durante 30 minutos/día durante 5 días/semana, las tres semanas siguientes hasta su sacrificio.

Dado el modelo experimental descrito, los diferentes grupos obtenidos para la realización del experimento se pueden clasificar en los siguientes: 1) un grupo expuesto a una auto-administración de sacarina y sin tratar, denominado grupo sacarina-vehículo; 2) otro grupo expuesto a una auto-administración de sacarina y tratados con fluoxetina, grupo sacarina-fluoxetina; 3) otro grupo expuesto a una auto-administración de alcohol y sin haber sido expuesto al tratamiento, denominado grupo EtOH-vehículo; y finalmente, otro grupo expuesto a una auto-administración de alcohol y que, a su vez, fueron tratados con fluoxetina, denominado EtOH-fluoxetina.

2. TÉCNICAS

2.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

Tras la última sesión de auto-administración de alcohol o sacarina de los respectivos grupos experimentales, correspondiente a la semana 26 de la fase de recaída (*1.2 Diseño del experimento, Ilustración 5*), todos los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico (50 mg/kg).

Una parte de los animales (n= 6/grupo) fueron perfundidos por vía intracardíaca con formaldehído al 4% en una solución de tampón fosfato (PB) 0,1M. Los animales se perfundieron a través de la inserción de un catéter por el ventrículo izquierdo. Tras la fijación de los animales, se llevó a cabo la extracción de los cerebros usando el material quirúrgico correspondiente, y se procesaron los cerebros íntegros para criopreservación con sacarosa al 30% en PB y congelación a -80 ° C. Posteriormente, los cerebros fueron

MATERIAL Y MÉTODO

cortados en secciones coronales de 30 μm de grosor mediante el empleo de un micrótomo de congelación (Leica SM2000R), de acuerdo a las siguientes áreas de interés para el estudio: la PrL, niveles Bregma desde 5,16 a 2,52 mm; el Str, niveles Bregma desde 2,28 a -0,12 mm; la BLA, niveles Bregma desde -2,04 a -3,60 mm; y el HC, niveles Bregma desde -2,04 a -4,68 mm (176) (Ver *Ilustración 6*). Las secciones fueron almacenadas a 4° C en PB con azida sódica al 0.002% hasta que se usaron para el análisis de inmunohistoquímica.

Los animales restantes (n=7/grupo) correspondientes a los grupos expuestos a autoconsumo de alcohol tratados y sin tratar con fluoxetina, se sacrificaron por decapitación. Se recolectaron los cerebros, y las áreas correspondientes a PrL, Str, BLA y HC se diseccionaron. Estas muestras se almacenaron a -80 ° C hasta que se usaron para el análisis de expresión de ARNm mediante RT-qPCR.

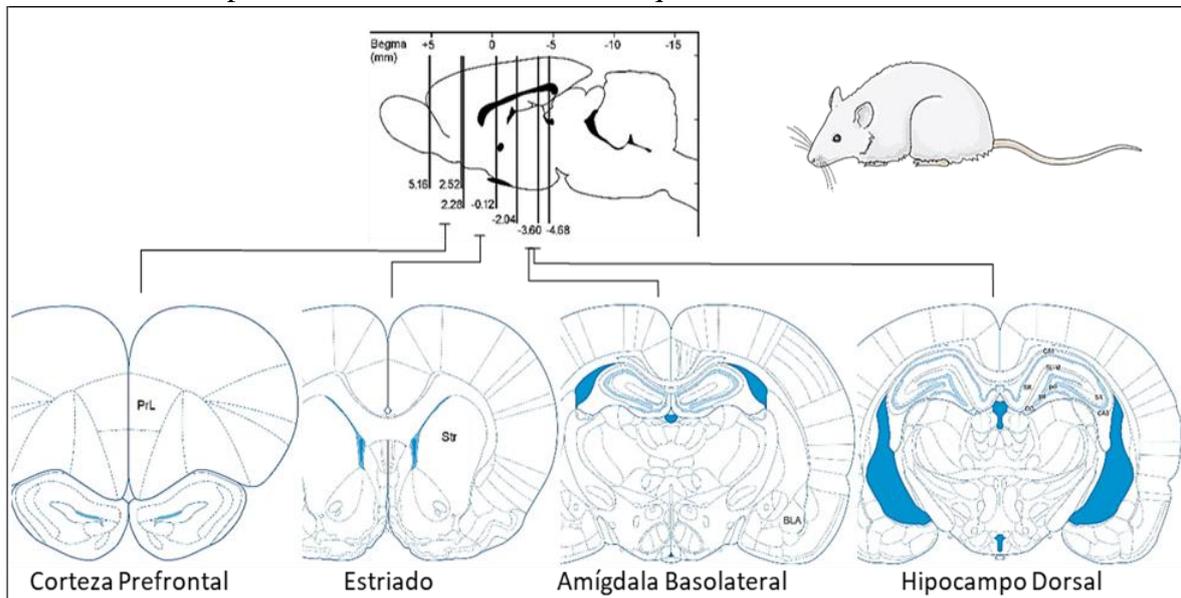


Ilustración 6. Áreas de interés analizadas en el experimento llevado a cabo. En la imagen podemos observar los distintos cortes de las áreas seleccionadas a estudiar, entre las cuales encontramos: La corteza prefrontal (PrL), el estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA), y el hipocampo dorsal (HC), más concretamente el área CA1 hipocámpal (CA1). Ver Paxinos & Franklin, 2001. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2ª edición. Academic Press.

MATERIAL Y MÉTODO

2.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

En primer lugar, se seleccionaron un mínimo de 8 secciones por región y cerebro de cada uno de los animales que constituían los 4 grupos experimentales (Sacarina-vehículo; Sacarina-fluoxetina; EtOH-vehículo; EtOH-fluoxetina).

Se realizaron 3 lavados iniciales, de 10 minutos cada uno, de los cortes en su tampón correspondiente con la finalidad de eliminar la azida sódica del PBS en el que se encontraban almacenados los cortes. En el caso de las pruebas que tuviesen un tampón distinto al de PBS, se hicieron dos lavados en PBS y un tercer lavado en su tampón correspondiente (cada lavado en tampón tenía la misma duración de 10 minutos). A continuación, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena mediante peróxido de hidrógeno (H_2O_2 al 30%) y metanol (CH_3OH al 10%) en su tampón de lavado, en oscuridad durante 20 minutos. Seguidamente, se llevó a cabo 3 lavados con tampón, y se realizó una incubación de 30 minutos a $80^{\circ}C$ en tampón citrato sódico a 50 mM y pH 6 (a excepción de este paso, todos los demás se realizaron a temperatura ambiente/TA). Seguidamente se llevaron a cabo otros 3 lavados en tampón. Tras los lavados, se llevó a cabo el bloqueo de posibles uniones inespecíficas del anticuerpo secundario (Ab II) mediante la incubación de los cortes en suero de pre-incubación (10% suero de burro o cabra, según correspondiera, tampón correspondiente del protocolo empleado y 0,01% azida sódica, excepto en tampón de Tris-PBS para CXCR4) durante 60 minutos.

Al finalizar el bloqueo de la peroxidasa endógena, se incubaron los cortes en su Ab I correspondiente (*Ver tabla 3 donde se muestra los anticuerpos primarios empleados para las pruebas de inmunohistoquímica*), durante toda la noche.

MATERIAL Y MÉTODO

Tabla 3 Anticuerpos primarios empleados para las pruebas de inmunohistoquímica

Anticuerpo Primario	Concentración de uso	Buffer empleado	Tiempo de incubación Ab II	Especie de producción Ab	Especie para reacción de Ab	Ag para inmunizar el host	Casa comercial	Referencia
IBA-1	1:1000	PBS-Tx 100 (0,2%)	1h	Conejo	Burro anti-conejo	Péptido sintético (C-terminal de Iba1)	Wako	019-19741
GFAP	1:500	PBS-Tx 100 (0,2%)	1h	Ratón	Cabra anti-ratón	GFAP de médula espinal de cerdo	Sigma-Aldrich	G3893
CX3CR1	1:500	PBS 0.1M pH 7.3	2h	Conejo	Burro anti-conejo	Péptido sintético correspondiente a CX3CR1 aa 2-21 humano (terminal N)	Abcam	ab8021
CXCR4	1:500	Tris-PBS 1X pH 7.8	2h	Conejo	Burro anti-conejo	Péptido sintético dentro de CXCR4 humano aa 300 al C-terminal (C terminal)	Abcam	ab124824
CCR2	1:300	PBS 0.1M pH 7.3	2h	Conejo	Burro anti-conejo	Péptido sintético tomado dentro de la región de aminoácidos 20-70 en la proteína CCR2 humana	Novus Biologicals	NBP1-78169

MATERIAL Y MÉTODO

A la mañana siguiente, los cortes se lavaron 3 veces en su tampón correspondiente durante 10 minutos cada uno. Acto seguido, los cortes se incubaron en el anticuerpo secundario (Ab II) biotinilado (anti-conejo producido en burro o anti-ratón producido en cabra; nº de cat. RPN1004, GE Healthcare, Barcelona, España. RRID: AB_1062582; y nº de cat. B7264, Sigma-Aldrich-Merck, San Luis, USA. RRID: AB_258607, respectivamente) durante 1-2 horas dependiendo del protocolo a seguir, a una dilución de 1:500. Tras la incubación en Ab II, se realizaron 3 lavados más en tampón (10 minutos/lavado), y se volvieron a incubar durante 60 minutos en el complejo ExtrAvidin-peroxidasa (nº de cat. E2886, Sigma-Aldrich-Merck, Darmstadt, Alemania. RRID: AB_2620165) a una dilución de 1:2000 en su tampón correspondiente. A partir de este paso, incluido, todos los siguientes se realizaron en oscuridad.

En el siguiente paso, se realizaron 3 lavados en su correspondiente tampón (10 minutos/lavado) para la posterior incubación con 0,05% de diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) y 0,05% de sulfato de níquel y amonio (Ni) durante 20 minutos, y finalmente se reveló la inmunotinción añadiendo 0,03% de H₂O₂.

Una vez revelada la marca de inmunotinción, se realizaron varios lavados en PBS, y se procedió a montar los cortes en portaobjetos tratados con poli-L lisina (Sigma).

Una vez montados, se dejaron secar a TA durante 24 horas y tapados con papel de fieltro para evitar la exposición a partículas de polvo en campana extractora. Seguidamente se deshidrataron los cortes con concentraciones crecientes de etanol y xileno para, posteriormente, cubrirlos con cubreobjetos y sellarlos con medio de montaje (Eukitt, Kindler GmbH & Co, Freiburg, Alemania).

2.2.1 CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOTINCIÓN

Empleamos un microscopio óptico estándar equipado con el objetivo 40X (Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Países Bajos) y acoplado al NIS-Elements Imaging Software 3.00 (Nikon) con el que se tomaron microfotografías digitales de alta resolución, bajo las mismas condiciones de luz y oscuridad para cada inmunotinción y experimento.

Las imágenes tomadas fueron de las regiones cerebrales de interés para este estudio: PrL, Str, BLA y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo y el giro dentado.

Se analizó un mínimo de 8 secciones coronales por estructura, lo que resultó en una de cada seis secciones equidistantes (una sección representativa por cada 180 μm) según la extensión rostro-caudal del cerebro. Las estimaciones del número de células IBA-1-inmunorreactivas (+) por área (mm^2) en ambos hemisferios se contaron manualmente de acuerdo con métodos estereológicos y se calcularon con base en la siguiente fórmula (166):

$$Na = \Sigma (Q-) / \Sigma (astr)$$

Donde $\Sigma Q-$ es el número total de células positivas (+) contadas por animal, y $astr$ es el área (mm^2) de la estructura analizada.

La cuantificación del número de células se expresó como el número medio de células IBA-1 + por área (mm^2) para cada grupo experimental. Para el análisis densitométrico, se determinó la cuantificación de la inmunorreactividad de IBA1, GFAP, CX3CR1, CCR2 y CXCR4 (unidades arbitrarias de intensidad) en áreas representativas de las regiones del cerebro utilizando el software ImageJ (NIH, EE. UU.).

MATERIAL Y MÉTODO

2.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA (Niveles relativos de ARNm)

Para este estudio, empleamos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (qPCR) para cuantificar la expresión del ARN mensajero de factores neuroinflamatorios (citocinas y quimiocinas anti-inflamatorias y pro-inflamatorias, y el TLR4, entre otros). Tanto las muestras biológicas como el material de investigación empleado para las pruebas mencionadas se mantuvieron bajo estrictos protocolos estandarizados específicamente en manipulación y limpieza en el área de trabajo del Laboratorio de Medicina Regenerativa (LMR) ubicado en el Hospital Regional Universitario de Málaga.

2.3.1 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DE LA MUESTRA

Empleamos el método Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD, USA) con el fin de aislar el ARN total de las muestras, en base a protocolos validados y descritos en estudios previos de nuestro grupo de investigación (174,177).

Tras la extracción y purificación del ARN, empleamos un espectrofotómetro para la medir la absorbancia del ARN a 260-280 nm y, a una dilución de 1/80 en agua ultra-pura libre de RNAsas, se determinó la concentración del ARN. Los ácidos nucleicos, como el ARN (Ácido ribonucleico) y el ADN (Ácido desoxirribonucleico), absorben la luz a 260 nm, mientras que otros elementos contaminantes (proteínas, lípidos, etc) tienen absorbancias diferentes de la misma (por ejemplo, 280 nm para las proteínas). Por ello, se calculó la ratio 260/280 nm como indicador del nivel de pureza y contaminación de las muestras de ARN. Para asegurarnos la replicación de un único producto para cada gen, tuvimos en cuenta valores situados en los estándares de 1,8-2,2.

MATERIAL Y MÉTODO

2.3.2 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

A continuación, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN mediante el uso de un termociclador y el método de transcripción inversa, de acuerdo a las indicaciones de Rivera P. & Cols. (166). Tras dicho proceso, se procedió a almacenar el ADNc a -20 °C, y su posterior empleo en la ejecución de las PCRs a tiempo real.

A continuación, la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un sistema de detección de PCR a tiempo real CFX96™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Este procedimiento consiste en una serie repetida de entre 35-40 ciclos caracterizados por 3 fases de temperaturas diferentes, que permiten a la enzima ADN polimerasa la síntesis de cadenas de ADN de interés, mediante el empleo de primers o cebadores específicos del gen a medir (Ver tabla 4 donde se muestra los primers empleados):

1ª fase: Consiste en la desnaturalización de la cadena de ADN, dejando las hebras complementarias separadas (95 °C).

2ª fase: Los primers o cebadores específicos del gen a medir se acoplan a las hebras de ADN desnaturalizado, delimitando el recorrido que la enzima ADN polimerasa empleará para la amplificación del gen de interés para el estudio (60 °C).

3ª fase: La enzima ADN polimerasa empieza a producir una hebra complementaria a la hebra original de ADN delimitada por los cebadores del gen. Este proceso se denomina elongación (70°C-80°C).

En esta última fase, la sonda TaqMan y el fluorocromo FAM (ThermoFisher Scientific), permiten detectar el incremento de hebras generadas en cada ciclo de la PCR a tiempo

MATERIAL Y MÉTODO

real, ya que, a mayor cantidad de ADNc sintetizado, mayor es la cantidad de señal percibida.

Esta señal es detectada por un termociclador, el cual establece un límite umbral en un ciclo determinado, denominado Ct (*Threshold time*). Una vez llegado a dicho valor umbral, se establece una proporción inversa entre el ciclo Ct y la cantidad de ADNc, de tal manera que a menor Ct, nos indicará que hay una mayor cantidad de ADNc inicial y, como consecuencia, una mayor expresión del gen que queremos medir.

Con el fin de aumentar la validez interna de la muestra, medimos en la muestra un gen de expresión constitutiva o gen de referencia que no experimentase alteraciones por las condiciones del experimento. En este caso establecimos que el gen de referencia sería *Gapdh*. A los valores de Ct de los genes de interés para el estudio se les restó el Ct de dicho gen constitutivo, de tal forma que los valores de la expresión de ARNm de factores inflamatorios se normalizaran en relación con los valores de Ct de la expresión de ARNm de *Gapdh*.

En este trabajo se analizaron los niveles de ARNm de los siguientes genes:

Cx3cl1 (fractalquina); *Cxcl12/SDF1* (factor 1 derivado de células estromales); *Ccl2/MCP-1* (proteína quimioatrayente de monocitos-1); *Tnfa* (factor de necrosis tumoral); *Il1 β* (interleukina 1 Beta); *Il-6* (Interleuquina 6); *Il-4* (Interleuquina 4); *Il-10* (Interleuquina 10); *Tgfb1* (factor de crecimiento transformante beta 1); *Bdnf* (factor neurotrófico derivado del cerebro); *Tlr4*; y *Gapdh* (gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa).

MATERIAL Y MÉTODO

Tabla 4 En esta tabla podemos observar los primers de los genes a medir por técnica de PCR para la realización del estudio.

Gene ID	GenBank accession numbers	Assay ID	Amplicon length
<i>CX3CL1 (Fractalkine)</i>	NM_134455.1	Rn00593186_m1	74
<i>CXCL12 (SDF1)</i>	NM_001033882.1	Rn00573260_m1	60
<i>CCL2 (MCP-1)</i>	NM_031530.1	Rn00580555_m1	95
<i>TNFα</i>	NM_012675.3	Rn01525859_g1	92
<i>IL1β</i>	NM_031512.2	Rn00580432_m1	74
<i>IL-6</i>	NM_012589.2	Rn01410330_m1	121
<i>IL-4</i>	NM_201270.1	Rn01456866_m1	128
<i>IL-10</i>	NM_012854.2	Rn01483988_g1	105
<i>TGFBI</i>	NM_021578.2	Rn00572010_m1	65
<i>BDNF</i>	NM_001270630.1	Rn02531967_s1	142
<i>TLR4</i>	NM_019178.1	Rn00569848_m1	127
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	Rn01775763_g1	174

2.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

En este estudio, utilizamos las muestras empleadas para la inmunohistoquímica de IBA-1, se adquirieron imágenes individuales de células de la microglía con la finalidad de llevar a cabo un proceso de análisis de la morfología de la célula microglial en las distintas áreas de interés para el estudio (PrL, Str, CA1, BLA) de los diferentes grupos experimentales.

2.4.1 ADQUISICIÓN DE LA IMAGEN

Se obtuvieron imágenes digitales en color de las regiones PrL, Str, CA1, BLA marcadas mediante inmunohistoquímica de IBA-1 y DAB-Ni utilizando un microscopio Olympus VS120. Las imágenes de alta resolución (tamaño del pixel = 115 nm^2), fueron obtenidas mediante el objetivo 60X empleando un aceite de inmersión UPLSAPO, enfocando en las áreas de interés para este estudio.

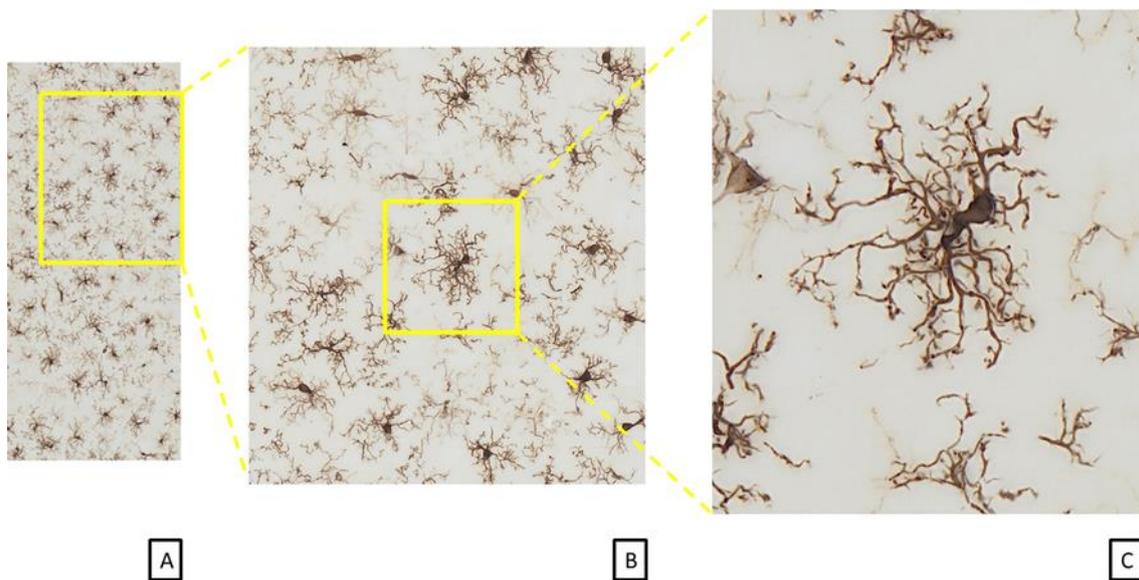


Ilustración 7 Esquema de la selección de células de la microglía con un objetivo 60X. En la imagen A, vemos la imagen original del portaobjetos. En la imagen B, vemos una selección de células, a partir de la cual, seleccionamos la célula que cumpla con los criterios de selección (Apartado 2.4.2 Procesamiento de la imagen), a continuación, escogemos una célula, Imagen C, y la procesamos (las tres imágenes pertenecen al mismo objetivo de 60X).

MATERIAL Y MÉTODO

Un modo virtual-Z multiplano permitió capturar 20 imágenes (1 μm de espesor) en 20 μm de profundidad de la sección de tejido seleccionada manualmente, que luego se combinaron para obtener una única imagen de alta calidad que incluía un aumento detallado de los procesos ramificados de las células (Ver *Ilustración 7 esquema de la selección de células de la microglía en microscopio con objetivo 60X*). Cada imagen fue obtenida en formato de archivo TIFF de 96 ppp (puntos por pulgada) y contenía al menos 30 células.

2.4.2 PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN

De estas imágenes se seleccionaron al azar células individuales, con el fin de delimitarlas, de acuerdo a una serie de criterios expuestos a continuación:

- ❖ Criterio 1: Selección aleatoria de cuerpos celulares microgliales en áreas de la CPF correspondientes a la PrL.
- ❖ Criterio 2: Selección aleatoria de cuerpos celulares microgliales desde el área más cercana al ventrículo lateral (LV) hacia el parénquima cerebral hasta una profundidad de aproximadamente 100 μm en la parte dorsal del estriado (Str).
- ❖ Criterio 3: Selección aleatoria de cuerpos celulares microgliales en la BLA.
- ❖ Criterio 4: Selección aleatoria de cuerpos celulares microgliales en todos los estratos radiatum (SR) y lacunosum-moleculare (SL-M) de la región CA1 del hipocampo.
- ❖ Criterios comunes <<*sine que non*>> a los anteriores:
 - ✓ Cada una de las células seleccionadas no podían estar superpuestas a otras, o aparecer en celdas vecinas a otras células sin superposición con celdas vecinas.
 - ✓ El núcleo y las ramas o procesos celulares debían de estar íntegros y completos en la imagen seleccionada.

MATERIAL Y MÉTODO

- ✓ La selección de las células se realizó aleatoriamente independientemente de la exposición al alcohol y/o al tratamiento, siguiendo los criterios anteriores.

Se analizaron 50 células al azar (Ver *Ilustración 7 esquema de la selección de células de la microglía con un objetivo 60X*), seleccionadas de 6 animales por grupo experimental (Ver apartado 2.2 *Inmunohistoquímica*) y región del cerebro (PrL, Str, CA1 y BLA). Se evaluó un total de 800 imágenes (200 imágenes/región y 50 imágenes/grupo).

Cada imagen de celda individual (Ver *Ilustración 8 Procesamiento de la imagen digital de la célula microglial*) se procesó de manera sistemática utilizando el software gratuito FIJI (Descarga gratuita disponible en <http://fiji.sc/Fiji>): 1st), una aplicación del software ImageJ. Después del procesamiento de imágenes de cada celda individual, obtuvimos una “imagen llena” (*Fill*) (*Ilustración 8-G*) y su contraparte “forma perfilada” (*Outline*) (*Ilustración 8-H*) en base a protocolos descritos anteriormente por miembros de nuestro equipo de investigación (165,166), y que se describen a continuación:

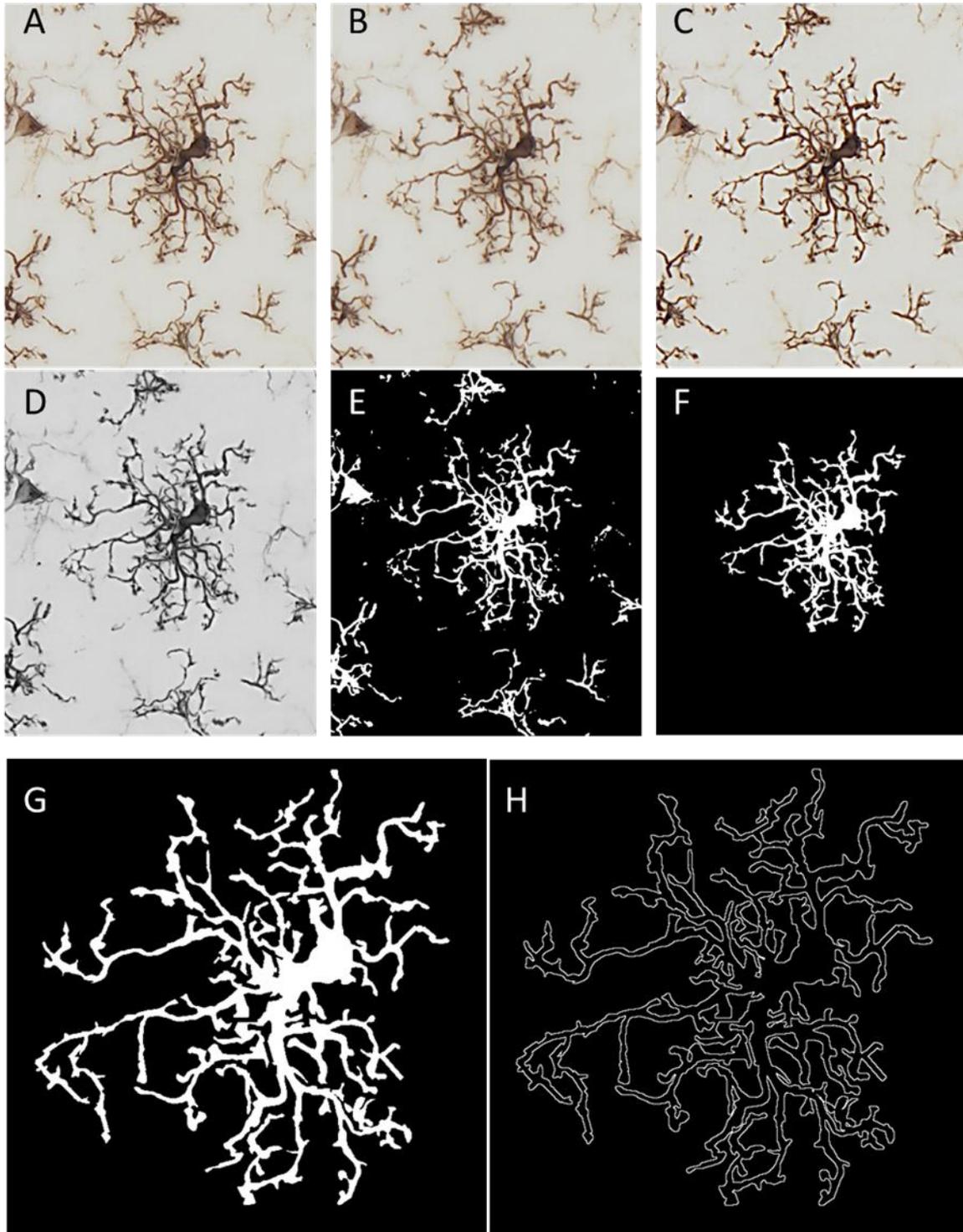


Ilustración 8 Procesamiento de la imagen digital de la célula microglial. De una Imagen seleccionada aleatoriamente (Ver Ilustración 7 esquema de la selección de células de la microglía con un objetivo 60X-Imagen C), se elimina el ruido de la imagen (A, B) y se filtra el fondo para adquirir una imagen de extracción de forma (C). Seguidamente, se transforma a una escala de grises (D), para binarizarla (E) empleando el mismo umbral en todas las imágenes. A partir de esta imagen, eliminamos el fondo y unimos las ramificaciones para obtener un conjunto de píxeles continuo en la imagen de la celda (F). Para concluir, recortamos la imagen y obtenemos la forma rellena de la célula (fill) (G) y su correspondiente forma delineada (outline) (H), para su análisis morfológico.

MATERIAL Y MÉTODO

- ✓ Paso 1: Filtrar la imagen para suavizar el fondo y mejorar el contraste de la misma (Ver *Ilustración 8 A y B*).
- ✓ Paso 2: Transformar la imagen a una escala con 256 posibles valores de grises, correspondientes a 8 bits de profundidad (Ver *Ilustración 8 B y C*).
- ✓ Paso 3: Binarizar la imagen con la finalidad de obtener una versión en blanco y negro de la misma. Para ello, se tomó como valor umbral de dicha binarización 165, de acuerdo a lo ya establecido en estudios previos de Fernández Arjona & cols. (165) (167) y Rivera & cols. (166) (Ver *Ilustración 8 C y D*).
- ✓ Paso 4: A partir de este paso, se procede a la edición manual de cada imagen o célula de forma individual, con la finalidad de que dicha imagen de celda esté constituida por un conjunto único y continuo de píxeles: se procedió a eliminar algunos píxeles para separar ramificaciones de los procesos celulares que ocupaban celdas vecinas, a la par que se añadieron algunos píxeles con el fin de unir procesos pertenecientes a la misma célula. Este procedimiento se llevó a cabo fijándose cuidadosamente en la imagen original de la celda (*Ilustración 8 A*), a la misma vez que se editaba la imagen binarizada, con el fin de evitar sesgos (Observar las diferencias entre las imágenes de la *Ilustración 8 E y F*).
- ✓ Paso 5: Tras la edición de la imagen, se procedió a recortarla para que el patrón de la célula estuviese en el centro de la misma. A continuación, se procede a guardar dicha imagen (*fill*) (Ver *Ilustración 8 F*), para su posterior análisis (Ver *Ilustración 8 G y H*).
- ✓ Paso 6: A partir de la imagen con el patrón celular relleno (*fill*), se procesa para extraer el mismo patrón celular de forma delineada (*outline*) (Ver *Ilustración 8 H*), y guardar dicha imagen para su posterior análisis.

MATERIAL Y MÉTODO

Una vez se procesaron las 800 células de forma individual, las imágenes rellenas y delineadas de dichas células se utilizaron posteriormente para el análisis morfométrico.

2.4.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Las imágenes rellenas (*fill*) y delineadas (*outline*) fueron procesadas para su análisis por el software Fraclac para ImageJ, disponible de forma gratuita en su página web (Karperien A., FracLac for ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fraclac/FLHelp/Introduction.htm>. 1999-2013; ImageJ, National Institutes of Health) (146). El análisis de dichas imágenes se basaba en medir las alteraciones morfológicas de las células microgliales en los cuatro grupos experimentales del estudio, en base a los factores de alcohol y tratamiento con fluoxetina, generando 15 parámetros morfométricos, que describimos a continuación (Ver *Ilustración 9*):

1. Dimensión fractal (D): Un parámetro introducido por Karperien & cols (146), hace referencia a la complejidad que adquiere la célula, en las diferentes escalas en las que se analiza. Ya Fernández-Arjona & cols. (165) explicaron este parámetro como el resultado de la pendiente de una regresión lineal simple entre datos, de tal forma que, si la imagen delineada es dividida en celdas, y estas a su vez en otras más pequeñas, de forma sucesiva, vamos obteniendo unos valores como resultado de una escala o serie de potencias, dando lugar a una pendiente resultante del promedio de las medidas realizadas, para cada imagen. Este parámetro ha demostrado ser muy útil para la diferenciación de estados intermedios de activación en células microgliales, desde formas redondeadas hasta ramas o procesos celulares altamente complejos.
2. Lacunaridad (λ): Mide la heterogeneidad o invariancia traslacional y rotacional en una forma. Valores bajos de λ nos indican homogeneidad entre las diferentes partes de la imagen de la célula analizada, mientras que una λ con valores altos, nos indican que las

MATERIAL Y MÉTODO

diferentes cuadrículas en las que se divide la celda de la imagen, difieren entre ellas en la distribución de los píxeles y, por tanto, contener distribuciones diferentes entre sí, por tanto, indica una mayor heterogeneidad. El valor de A obtenido fue un coeficiente de variación expresado como densidad de píxeles por caja en función del tamaño de la caja. Para evitar sesgos en los resultados de A , se calculó la media de distribución de masa por escalas de series de potencia y también con doce ubicaciones de cuadrícula (178).

3. Área celular (CA): se cuantificó como el número total de píxeles presentes en la forma rellena (*fill*) de la imagen de la celda, que luego se transformó en micrómetros cuadrados (área de píxel = $0,013 \mu\text{m}^2$).
4. Área del polígono convexo (CHA): corresponde al polígono convexo más pequeño que contiene la forma de la celda completa, y contiene todos los ángulos interiores menores de 180° .
5. Densidad: es el resultado del cociente del área celular y el área del polígono convexo (CA/CHA).
6. Perímetro celular (CP): se mide en base a la forma de la imagen delineada (*outline*) como el número de píxeles expresados en micras (donde el lado del píxel es de $0,115 \mu\text{m}$).
7. Perímetro del polígono convexo (CHP): corresponde al contorno de la forma delineada (*outline*) del polígono convexo, expresado en micras.
8. Rugosidad: es el resultado del cociente entre el perímetro celular (CP) y el perímetro del polígono convexo (CHP) (CP/CHP).
9. Ratio de las medidas del polígono convexo (CHSR – Convex Hull Span Ratio): también conocido como factor de forma, es el resultado del cociente entre el eje mayor y el eje menor del polígono convexo (M/m).
10. Circularidad celular (CC): es el resultado del cociente entre $4\pi \cdot CA$ y CP ($4\pi \times CA/CP$).
A valores más cercanos a 1, mayor aspecto circular adquiere la forma de la célula.

MATERIAL Y MÉTODO

11. Circularidad del polígono convexo (CHC): es el resultado de calcular $4\pi \times CHA / CHP$.
12. Diámetro del círculo delimitante (BCD): corresponde al diámetro expresado en micras (μm) del círculo más pequeño que engloba al polígono convexo.
13. La máxima distancia que atraviesa el polígono convexo (MSACH): corresponde a la distancia máxima entre dos puntos a través del polígono convexo.
14. La ratio entre el radio máximo y el radio mínimo del polígono convexo (RCHR – The ratio convex hull radii): es el resultado de dividir el radio más grande entre el radio más pequeño, tomando como punto de partida el centro del polígono convexo, hasta un punto exterior.
15. El radio medio (Mean Radius): corresponde a la media de la longitud (μm) de las medidas del centro del polígono convexo a diferentes puntos exteriores a este.

MATERIAL Y MÉTODO

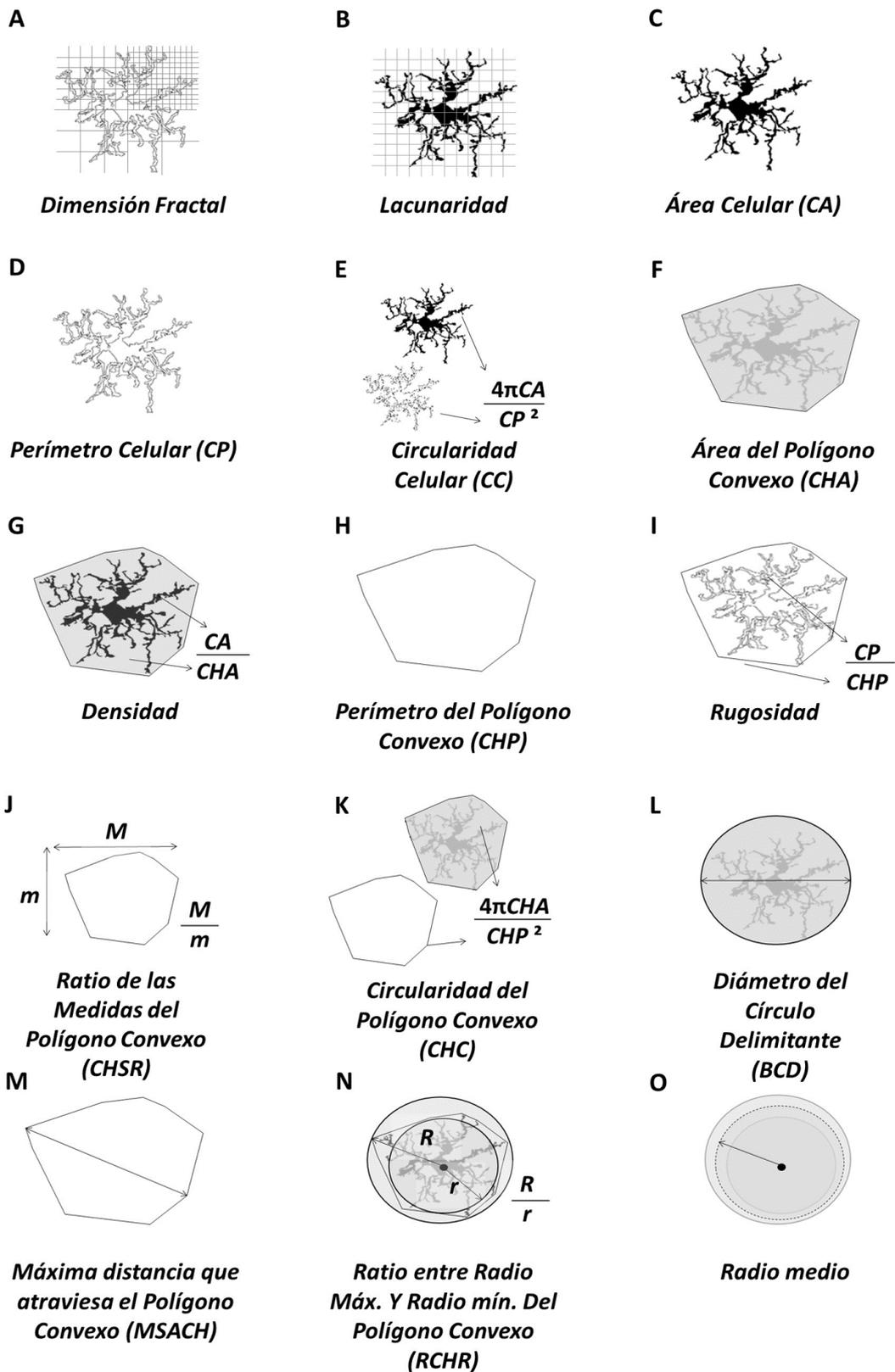


Ilustración 9. 15 Parámetros morfométricos empleados para el análisis de las imágenes correspondientes a las células microgliales del experimento.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las comparaciones de datos se llevaron a cabo utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). Los datos sobre la inmunorreactividad de IBA-1 y el resto de inmunohistoquímicas (Ver apartado 2.2 *Inmunohistoquímica*), el número de células IBA-1 + por área (mm^2), los parámetros morfométricos de la microglía y la expresión relativa de ARNm de factores inflamatorios se representaron como medias \pm error estándar de la media (SEM). La n indica el número de animales ($n = 6-7$) o células registradas ($n = 50$) por grupo experimental.

- Se utilizó el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para verificar la distribución gaussiana. La significación estadística para la inmunohistoquímica y la morfología microglial de IBA-1 se determinó mediante ANOVA de 2 vías con la bebida (sacarina versus alcohol) y el tratamiento (vehículo versus fluoxetina) como factores principales. Se llevaron a cabo las pruebas post hoc de Tukey para comparación múltiple cuando era apropiado.
- La significación estadística para la expresión de ARNm se determinó mediante la prueba t de Student (comparaciones entre dos grupos) para datos no apareados.
- Para analizar si el cese del tratamiento con fluoxetina inducía cambios en la asociación entre los parámetros, se realizó un análisis del modelo de correlación de Pearson y se calcularon los valores Rho (bondad de ajuste).

En todos los casos el nivel de significancia estadística fue de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

RESULTADOS

1. EL CESE DEL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA AUMENTA EL AUTOCONSUMO DE ALCOHOL DURANTE LA REEXPOSICION

En las ratas que fueron tratadas con fluoxetina durante el período de privación de autoadministración de alcohol, pudimos detectar un aumento significativo en la autoadministración semanal de alcohol durante el período de reexposición al mismo (Ver *Ilustración 10*). El análisis ANOVA indicó un efecto general del tratamiento sobre la autoadministración de alcohol durante las tres semanas de reexposición al mismo ($F_{1,72} = 26,66$; $p < 0,0001$). Las ratas que fueron tratadas con fluoxetina experimentaron un incremento en el consumo de alcohol durante la fase de reexposición a este (análisis post hoc: * $p < 0,05$ frente a ratas expuestas a etanol tratadas con vehículo). Cuando se introdujo el período de “línea base” (datos iniciales de referencia de autoconsumo, antes de la exposición al tratamiento antidepresivo) en el análisis estadístico, observamos interacción entre el tiempo y el tratamiento ($F_{3,96} = 3,56$; $p < 0,02$), indicándonos que el cese del tratamiento con fluoxetina pudo modificar la autoadministración de alcohol durante la fase de reinstauración del consumo, en comparación con la autoadministración de alcohol en la “línea base”.

RESULTADOS

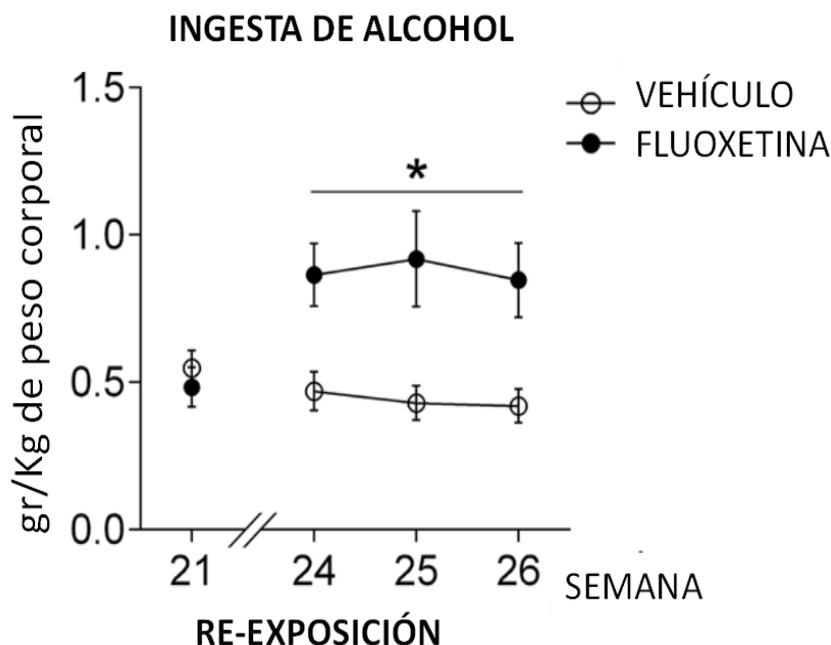


Ilustración 10 Representación gráfica del autoconsumo de alcohol durante la reexposición tras el cese del tratamiento con fluoxetina.

2. ANÁLISIS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA IBA-1 EN ÁREAS DEL SISTEMA DE RECOMPENSA

Para analizar los efectos del cese abrupto del tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia de etanol y el restablecimiento del autoconsumo de etanol en las células de la microglía en las áreas del sistema de recompensa del cerebro, cuantificamos el número de células IBA-1+ y la inmunorreactividad (intensidad) de IBA-1 en la PFC, Str, BLA, y las áreas del HC CA1, CA3 y giro dentado (DG, en inglés “*Dentate Gyrus*”).

2.1. EL CONSUMO DE ETANOL AUMENTA LA INMUNORREACTIVIDAD DE IBA-1 EN EL CEREBRO

Observamos un efecto del autoconsumo de etanol sobre la inmunorreactividad de IBA-1, en las regiones correspondientes a PFC ($F_{1,20} = 12,13$; $p = 0,0027$), Str ($F_{1,20} = 29,88$; $p < 0,0001$) y BLA ($F_{1,20} = 46,08$; $p < 0,0001$), mostrando una mayor intensidad tanto en ratas expuestas a etanol (** / *** $p < 0,01 / 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina) como en ratas expuestas a etanol y tratadas con fluoxetina (\$\$\$ $p < 0,001$ frente a ratas expuestas

RESULTADOS

a sacarina tratadas con fluoxetina, *Ilustración 11 A-I*). Sin embargo, no observamos cambios significativos en el número de células de IBA-1+ correspondientes a las regiones mencionadas. Tampoco observamos efecto del tratamiento (fluoxetina) ni interacción entre la bebida y el tratamiento (ANOVA de 2 vías) en dichas regiones.

Observamos un efecto significativo general en el número de células IBA-1+ pertenecientes al HC ($F_{1,20} = 15,03$; $p = 0,001$), más específicamente en el área DG ($F_{1,20} = 154,4$; $p < 0,0001$), tanto en ratas expuestas a etanol (***) $p < 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina) como en ratas expuestas a etanol y tratadas con fluoxetina (\$\$\$ $p < 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina tratadas con fluoxetina, *Ilustración 12*). No observamos efecto en los factores de estudio etanol, tratamiento con fluoxetina, ni interacción entre ambos factores (ANOVA de 2 vías) en CA1 ni CA3 en referencia al número de células IBA-1+.

El etanol ejerció un efecto notable de forma general sobre la inmunorreactividad de IBA-1 en el HC ($F_{1,20} = 31,36$; $p < 0,0001$), tanto en el DG ($F_{1,20} = 21,41$; $p < 0,001$), CA3 ($F_{1,20} = 22,15$; $p < 0,001$) como CA1 ($F_{1,20} = 32,67$; $p < 0,0001$).

El etanol, a su vez, aumentó la inmunorreactividad de IBA-1 en estas regiones del HC de ratas expuestas a etanol (** / *** $p < 0,01 / 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina) y ratas expuestas a etanol con tratamiento fluoxetina (\$ / \$\$ $p < 0,05 / 0,01$ frente a ratas expuestas a sacarina y tratadas con fluoxetina, *Ilustración 12*). Respecto al factor tratamiento y la interacción entre los factores etanol y tratamiento, no pudimos observar ningún efecto de interés para el estudio en la zona del HC. Tal y como podemos apreciar en las imágenes representativas correspondientes a la expresión inmunohistoquímica de IBA-1 y la densidad de la inmunorreactividad de las células IBA-1 + que se muestran en la *Ilustración 12*.

RESULTADOS

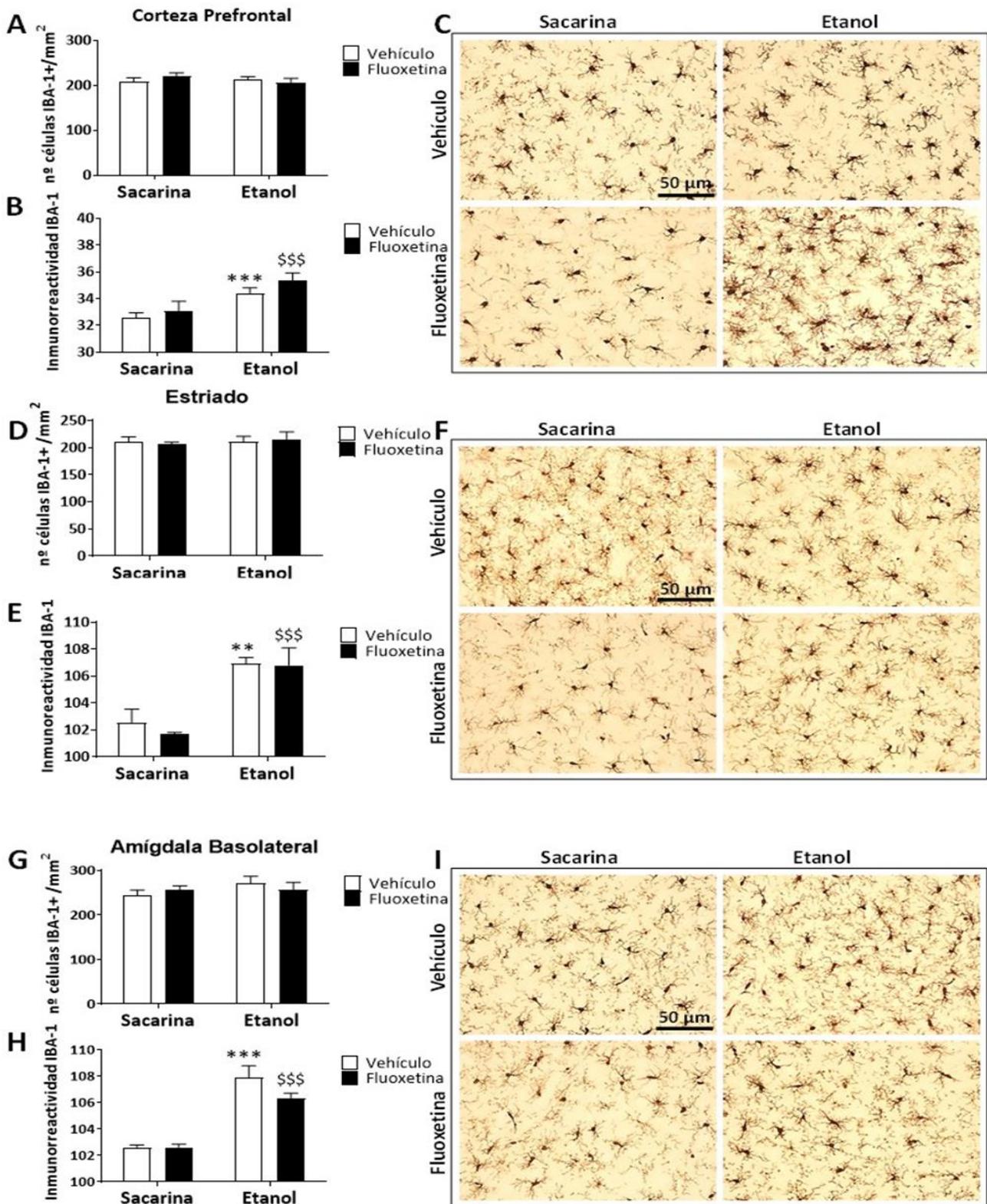


Ilustración 11 Resultados de la prueba de Inmunohistoquímica IBA-1 en las áreas cerebrales corteza prefrontal (PrL), estriado (Str) y Amígdala Basolateral (BLA). Los histogramas representan la Media \pm SEM. Prueba de Tukey: * / ** / *** $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo de sacarina-vehículo; \$ / \$\$ / \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo sacarina-fluoxetina.

RESULTADOS

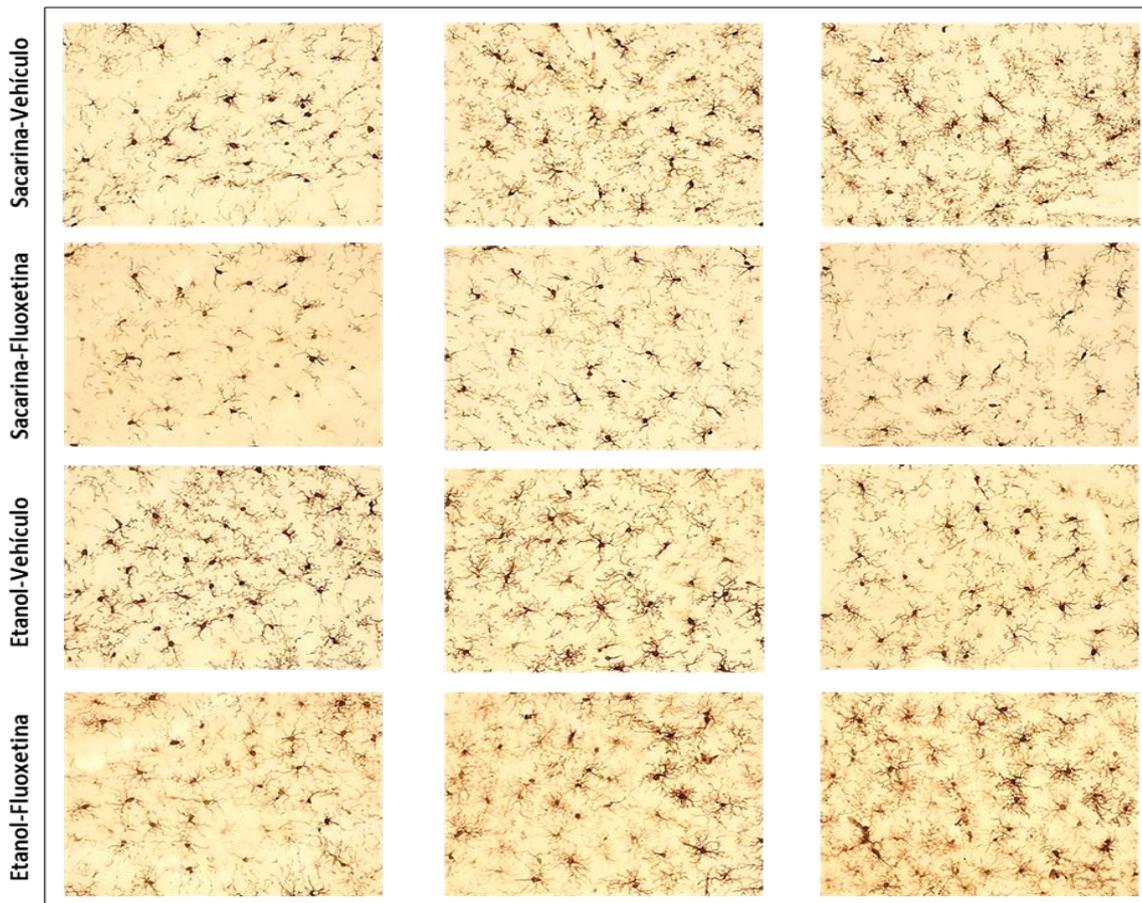
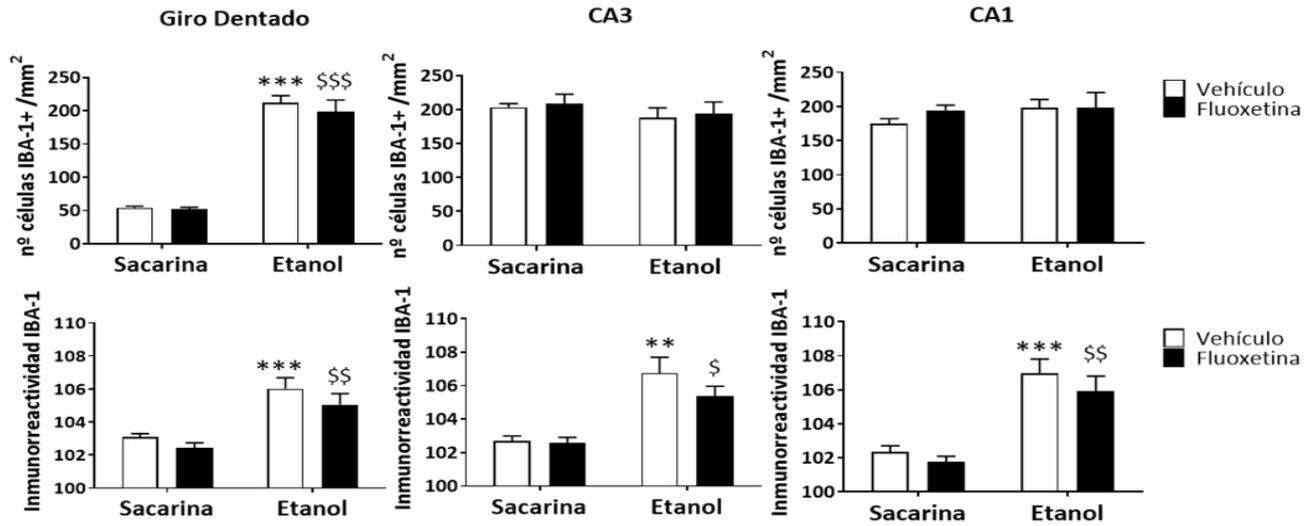


Ilustración 12 Resultados de la prueba de Inmunohistoquímica IBA-1 en el área cerebral del hipocampo (HC), concretamente las áreas correspondientes a giro dentado, CA1 Y CA3. Los histogramas representan la Media \pm SEM. Prueba de Tukey: **/*** $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo de sacarina-vehículo; \$/ \$\$/ \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo sacarina-fluoxetina.

RESULTADOS

3. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LA MICROGLÍA (IBA-1)

Con el fin de realizar una evaluación más exhaustiva del comportamiento de las células de la microglía en el SNC, más concretamente en el sistema de recompensa, en este modelo de recaída de autoconsumo de alcohol con tratamiento antidepresivo, llevamos a cabo el análisis de 15 parámetros morfométricos, mencionados en apartados anteriores, en las cuatro regiones de interés: Hipocampo dorsal (CA1), PrL, Str y BLA.

3.1. EL CESE ABRUPTO DEL TRATAMIENTO CON FLUOXETINA PREVIO A LA REINSTAURACIÓN DEL AUTOCONSUMO DE ALCOHOL PRODUCE CAMBIOS ESPECÍFICOS EN LA MORFOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MICROGLIALES EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN DE ESTUDIO DEL SISTEMA DE RECOMPENSA

Tras el análisis de inmunohistoquímica para IBA-1 realizado en el apartado anterior, nos propusimos analizar si los cambios ejercidos por el alcohol, traducidos en una mayor inmunorreactividad de las diferentes áreas de interés, podían estar asociados a modificaciones fenotípicas y morfológicas de las células microgliales que expresan el marcador IBA-1 en las regiones PrL, Str, BLA y CA1 del HC. A su vez, se propuso evaluar la posible influencia que genera el cese abrupto de la administración del antidepresivo fluoxetina (ISRS) en los cambios generados sobre la morfología de las células microgliales, y si este, a su vez, modifica el supuesto efecto producido por el propio autoconsumo de alcohol (*Ilustraciones 13,14 y 15*).

RESULTADOS

3.1.1. EFECTO DEL ETANOL EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA

CORTEZA PRELÍMBICA/PREFRONTAL

Apreciamos cómo el consumo de etanol generó efectos significativos en parámetros morfométricos de interés (frente a los grupos expuestos a sacarina), como son: la dimensión fractal (o complejidad espacial), la lacunaridad (heterogeneidad), la rugosidad (referente a la superficies y ramificación de los procesos celulares), el área y el perímetro celular, y la circularidad celular en la células microgliales correspondientes a la PrL ($F_{1, 196}=4,88$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=12,1$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=8,15$, $p<0,01$; $F_{1, 196}=7,27$, $p<0,01$; $F_{1, 196}=7,67$, $p<0,01$; $F_{1, 196}=9,42$, $p<0,01$, respectivamente).

ESTRIADO

El área de estudio correspondiente al Str fue la más influenciada por el efecto del autoconsumo de etanol (frente a los grupos expuestos al autoconsumo de sacarina), en la gran mayoría de los parámetros morfométricos de la microglía: la dimensión fractal, el área celular, el perímetro celular, la circularidad celular, el área del círculo convexo (CHA), la densidad (hace referencia a cuan de acortados o concentrados se encuentran los procesos celulares), el perímetro del círculo convexo (CHP), la rugosidad, la circularidad del círculo convexo (CHC), el diámetro del círculo limitante (BCD), la extensión máxima de un punto a otro a través del círculo convexo (MSACH) y el Radio medio (MR) ($F_{1, 196}=10,4$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=18,4$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=10,8$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=11,1$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=5,00$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=8,77$, $p<0,003$; $F_{1, 196}=5,84$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=10,6$, $p<0,002$; $F_{1, 196}=4,05$, $p<0,05$; $F_{1, 196}=5,10$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=4,98$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=5,63$, $p<0,02$, respectivamente).

RESULTADOS

AMÍGDALA BASOLATERAL

En el área BLA, no observamos una destacada influencia del autoconsumo de etanol en la morfología de las células microgliales. Tan solo pudimos observar que los parámetros correspondientes a la lacunaridad y la densidad de dichas células se vieron afectadas ($F_{1, 196}=3,75$, $p<0,05$; $F_{1, 196}=8,52$, $p<0,004$, respectivamente) pero no apreciamos efectos significativos por el factor etanol en los parámetros morfométricos restantes de dicha región.

HIPOCAMPO DORSAL (ÁREA CA1)

En el HC, más concretamente el área de estudio CA1, observamos un efecto destacado del autoconsumo de etanol en la mayoría de los parámetros morfométricos: la dimensión fractal, el área celular, el perímetro celular, el área del círculo convexo (CHA), el perímetro del círculo convexo (CHP), la rugosidad, el cociente de extensión de los puntos equidistantes del perímetro convexo (CHSR), el cociente entre el radio máximo y mínimo del perímetro convexo (RCHR), y el radio medio (MR) ($F_{1, 196}=6,10$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=25,4$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=21,2$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=11,6$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=6,96$, $p<0,01$; $F_{1, 196}=9,41$, $p<0,003$; $F_{1, 196}=32,4$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=26,3$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=5,32$, $p<0,03$, respectivamente). No obstante, hubo parámetros relevantes que no experimentaron modificaciones por el efecto del factor etanol (la lacunaridad, densidad, circularidad celular, circularidad del círculo convexo (CHC), diámetro del círculo delimitador (BCD), la extensión máxima de un punto a otro a través del círculo convexo (MSACH)).

RESULTADOS

3.1.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIDEPRESIVO FLUOXETINA (ISRS) EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA

CORTEZA PRELÍMBICA/PREFRONTAL

Se observaron parámetros morfométricos con efectos significativos en las células microgliales de las ratas expuestas al tratamiento (frente a ratas expuestas al vehículo) de la PrL, a saber: el BCD, MSACH y el radio medio (MR) ($F_{1, 196}=6,10$, $p<0,05$; $F_{1, 196}=6,16$, $p<0,05$; $F_{1, 196}=4,36$, $p<0,05$, respectivamente). El resto de parámetros no experimentaron modificaciones de relevancia significativa por la exposición al factor tratamiento.

ESTRIADO

Se encontraron efectos significativos del tratamiento en parámetros morfométricos relevantes como la dimensión fractal, el perímetro celular, la circularidad de la célula, la CHA, el CHP y la rugosidad de la microglía estriatal ($F_{1, 196}=5,75$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=4,19$, $p<0,04$; $F_{1, 196}=4,69$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=5,03$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=4,20$, $p<0,04$; $F_{1, 196}=4,22$, $p<0,04$, respectivamente) frente a la microglía de las ratas correspondientes al grupo sacarina vehículo.

AMÍGDALA BASOLATERAL

No encontramos efecto alguno del factor tratamiento en ninguno de los parámetros morfométricos de las células microgliales pertenecientes a la BLA.

RESULTADOS

HIPOCAMPO DORSAL (ÁREA CA1)

Pudimos observar que los animales tratados con fluoxetina, presentaron modificaciones relevantes de forma significativa a causa del efecto producido por dicho factor en: la dimensión fractal, la circularidad celular (CC), la CHA, la densidad, el CHP, la circularidad del polígono convexo (CHC), el BCD, el MSACH y el radio medio (MR) ($F_{1, 196}=4,75$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=11,2$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=6,54$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=5,38$, $p<0,03$; $F_{1, 196}=6,76$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=34,4$, $p<0,000$; $F_{1, 196}=6,96$, $p<0,01$; $F_{1, 196}=6,74$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=7,59$, $p<0,007$, respectivamente).

3.1.3. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN ENTRE LOS FACTORES ETANOL Y TRATAMIENTO

Tras observar los cambios generados de manera independiente de los factores de estudio (etanol y tratamiento), pudimos observar que hubo interacción entre los factores en determinados parámetros, obteniendo los siguientes hallazgos en las regiones de interés para el estudio:

CORTEZA PRELÍMBICA/PREFRONTAL

En la PrL, únicamente hallamos que hubo interacción entre factores (etanol frente tratamiento) en el parámetro morfométrico rugosidad ($F_{1,196}=4,10$, $p<0,05$). Este hallazgo nos sugiere que los animales que fueron tratados con fluoxetina, y su cese abrupto seguido de la reinstauración del autoconsumo de etanol, potencia un aumento significativo de la superficie de los procesos celulares y las ramificaciones de las células microgliales de esta área.

RESULTADOS

ESTRIADO

La interacción entre factores de estudio se detectó únicamente en el parámetro de circularidad celular ($F_{1,196}=4,25$, $p<0,04$), sugiriéndonos que la fluoxetina ejerce un papel determinante, y dependiente al autoconsumo de etanol, a la hora de disminuir la proporción entre el área y el perímetro celular de las células microgliales del Str.

AMÍGDALA BASOLATERAL

En la BLA pudimos apreciar un leve efecto significativo de la interacción entre los factores de estudio (etanol y tratamiento) en los parámetros perímetro celular (CP), circularidad celular (CC), la CHA y el CHP ($F_{1,196}=3,13$, $p<0,07$; $F_{1,196}=4,49$, $p<0,03$; $F_{1,196}=3,69$, $p<0,05$; $F_{1,196}=3,52$, $p<0,06$, respectivamente). Aunque los datos puedan mostrarnos ciertas modificaciones en parámetros relacionados con la longitud espacial y forma de las células microgliales en la BLA, no es una región que haya reflejado resultados relevantes al respecto.

HIPOCAMPO DORSAL (ÁREA CA1)

En el área CA1 del HC, pudimos observar interacción en la dimensión fractal, la lacunaridad y la densidad ($F_{1, 196}=5,93$, $p<0,02$; $F_{1, 196}=13,9$, $p<0,001$; $F_{1, 196}=11,4$, $p<0,01$, respectivamente) de las células microgliales. En base a estos datos, pudimos apreciar que la fluoxetina, como variable dependiente del alcohol, ejercía un rol importante a la hora de disminuir la complejidad espacial de estas células y, a su vez, incrementaba la heterogeneidad y variedad intercelular mediante el aumento de la longitud de los procesos celulares y la tendencia a modificarlos, haciéndolos más estrechos y delgados y, por tanto, transformando el espacio que ocupa el área celular.

RESULTADOS

3.1.4 ANÁLISIS DE LOS EFECTOS SIMPLES

Para facilitar la comprensión de los resultados obtenidos en el estudio, respecto a los efectos simples, iremos describiendo estos hallazgos en base a los parámetros que aparecen por orden en las *Ilustraciones 13, 14 y 15*.

A. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA DIMENSIÓN FRACTAL, LA LACUNARIDAD, EL ÁREA, EL PERÍMETRO Y LA CIRCULARIDAD CELULAR

El parámetro dimensión fractal, referido a la complejidad espacial que adquiere la célula, se vio aumentado a causa del etanol en el Str de los animales tratados con el vehículo (* $p < 0,05$, *Ilustración 13 B*), y en la PrL, Str, BLA y CA1 de los animales tratados con fluoxetina (\$ / \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 13 A-D*). Los animales expuestos a sacarina que previamente fueron tratados con fluoxetina, experimentaron un aumento de este parámetro en el Str mientras que disminuía en el área CA1 (* $p < 0,05$, *Ilustración 13 B, D*).

En cuanto a la lacunaridad, que hace referencia a la heterogeneidad intercelular (medida que indica como los patrones o fractales ocupan el espacio), el etanol disminuyó dicho parámetro en el área CA1 de los animales tratados con vehículo (* $p < 0,05$, *Ilustración 13 H*) y en la PrL y el área CA1 del hipocampo en las ratas tratadas con fluoxetina (\$\$ $p < 0,01$, *Ilustración 13 E, H*). En el caso de la fluoxetina, esta aumentó la lacunaridad en PrL y CA1 de los animales expuestos a sacarina (* / *** $p < 0,05 / 0,001$, *Ilustración 13 E, H*).

En relación al área celular, que nos informa acerca del proceso de ramificación y/o el agrandamiento del soma celular, podemos observar un incremento con el etanol en el Str y el área CA1 en los animales tratados con vehículo (** / *** $p < 0,01 / 0,001$, *Ilustración*

RESULTADOS

13 J, L), al igual que en PrL, Str, BLA y CA1 de los animales tratados con fluoxetina (\$ / \$\$ / \$\$\$ p <0,05 / 0,01 / 0,001, *Ilustración 13 I-L*). En los animales expuestos a sacarina, que fueron tratados previamente con fluoxetina, este parámetro disminuyó en la PrL y aumentó en el Str (* p <0,05, *Ilustración 13 I, J*). La fluoxetina produjo un aumento del área celular microglial en el área CA1 hipocampal de las ratas expuestas a etanol (# p <0,05, *Ilustración 13 L*).

Con respecto al perímetro celular, podemos observar que el etanol incrementaba dicho parámetro en las áreas CA1 hipocampal y Str de las ratas tratadas con vehículo (* / ** p <0,05 / 0,01, *Ilustración 13 N, P*). A su vez, el etanol también modificó el perímetro al alza en la PrL y el área CA1 hipocampal de los animales tratados con fluoxetina (\$ / \$\$\$ p <0,05/0,001, *Ilustración 13 M, P*).

La Circularidad Celular (CC) experimentó una disminución en las células microgliales del Str en los animales tratados con vehículo y expuestos a etanol (*** p <0,001, *Ilustración 13 R*), y en la PrL de los animales tratados con la fluoxetina y expuestos a etanol (\$\$ p <0,01, *Ilustración 13 Q*). Respecto a los animales tratados con fluoxetina y expuestos a sacarina, la CC también se vio mermada en el área CA1 hipocampal y Str (** p <0,01, *Ilustración 13 R, T*). No obstante, cabe destacar el efecto específico que ejerció la fluoxetina sobre la CC en el área CA1 hipocampal, viéndose esta disminuida en las ratas expuestas a etanol (# p <0,05, *Ilustración 13 T*).

RESULTADOS

B. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA DENSIDAD, LA RUGOSIDAD, EL ÁREA DEL POLÍGONO CONVEXO, EL PERÍMETRO DEL POLÍGONO CONVEXO Y LA CIRCULARIDAD DEL POLÍGONO CONVEXO

El parámetro morfométrico área del polígono convexo (CHA) se vio aumentado por el etanol en los animales tratados con vehículo, concretamente en las áreas CA1 hipocampal y Str (** p <0,01, *Ilustración 14 B, D*). Este parámetro también experimentó la misma modificación al alza en los animales expuestos a etanol y tratados con fluoxetina, en la PrL y el área CA1 (§ p <0,05, *Ilustración 14 A, D*). En los animales expuestos a sacarina, la fluoxetina hizo disminuir la CHA en la PrL y la BLA, pero hizo el efecto contrario en el Str y el área CA1 hipocampal (* / ** p <0,05 / 0,01, *Ilustración 14 A-D*).

Los animales expuestos al etanol y tratados con vehículo experimentaron un aumento en la densidad de las células microgliales pertenecientes a la BLA (** p <0,01, *Ilustración 14 G*). También ocurrió el mismo fenómeno en los animales expuestos al etanol y tratados con fluoxetina, en el Str y el área CA1 (§ / \$\$ p <0,05 / 0,01, *Ilustración 14 F, H*). Sin embargo, en los animales expuestos a sacarina, la fluoxetina ejerció un rol específico en la reducción de la densidad de las células de la microglía del área CA1 hipocampal (***) p <0,001, *Ilustración 14 H*).

Acerca del CHP, el grupo de animales expuestos a etanol y tratados con vehículo, experimentaron un aumento de dicho parámetro en la microglía del Str y el área CA1 hipocampal (* / ** p <0,05 / 0,01, *Ilustración 14 J, L*). Este efecto también lo pudimos observar en el grupo de animales tratados con fluoxetina y expuestos a etanol, más concretamente en la PrL (§ p <0,05, *Ilustración 14 I*). En cuanto al grupo de ratas tratadas con fluoxetina y expuestas a sacarina, pudimos observar como el CHP tiende a disminuir en las células pertenecientes a la PrL y la BLA (*p <0,05, *Ilustración 14 I, K*), un efecto curiosamente similar al descrito anteriormente en el parámetro CHA (*p <0,05,

RESULTADOS

Ilustración 14 A, C). No obstante, la fluoxetina ejerció un efecto contrario en este mismo grupo de animales, en el Str y el área CA1 (* / ** $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 14 J, L*).

Con respecto a la rugosidad, pudimos apreciar un aumento de dicho parámetro en las áreas correspondientes a Str y CA1 de los grupos de animales tratados con vehículo y expuestos a etanol (* / ** $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 14 N, P*). Este resultado también lo pudimos observar en las áreas PrL, BLA y CA1 del grupo de animales expuestos a etanol y tratados con fluoxetina (\$ / \$\$ / \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$, *Ilustración 14 M, O, P*). Por otra parte, cabe observar el aumento específico que ejerce la fluoxetina en el parámetro rugosidad de las células de la microglía estriatal de los animales expuestos a sacarina (* $p < 0,05$, *Ilustración 14 N*).

En el parámetro circularidad del polígono convexo (CHC) podemos observar un aumento debido a la fluoxetina tanto en la microglía de las regiones BLA y CA1 de las ratas expuestas a etanol (# / ### $p < 0,05 / 0,001$, *Ilustración 14 S, T*), como en la microglía de la región CA1 correspondiente a las ratas expuestas a sacarina (* ** $p < 0,001$, *Ilustración 14 T*).

RESULTADOS

C. ANÁLISIS DE EFECTOS SIMPLES EN LA RELACIÓN DE EXTENSIÓN DEL POLÍGONO CONVEXO (CHSR), EL DIÁMETRO DEL CÍRCULO LIMITANTE (BCD), LA EXTENSIÓN MÁXIMA A TRAVÉS DEL POLÍGONO CONVEXO (MSACH), EL COCIENTE ENTRE EL RADIO MÁXIMO Y EL RADIO MÍNIMO DE LOS CÍRCULOS LIMITANTES EXTERNO E INTERNO DEL POLÍGONO CONVEXO (RCHR) Y EL RADIO MEDIO.

El parámetro CHSR se vio disminuido solamente en las células microgliales del área CA1 hipocampal de los animales expuestos a etanol, tanto en los tratados con vehículo, como en aquellos tratados con fluoxetina (***/ \$\$\$ $p < 0,001$, *Ilustración 15 D*). Este parámetro no se vio alterado de forma significativa en el resto de áreas de estudio o grupos de animales.

En relación al BCD, podemos observar como el etanol produce un aumento de dicho parámetro en la microglía del Str de las ratas tratadas con vehículo (* / ** $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 15 F*). Por otra parte, las ratas expuestas a sacarina y tratadas con el antidepresivo fluoxetina, experimentaron una disminución de este parámetro en la región PrL (* $p < 0,05$, *Ilustración 15 E*) y, de forma contraria, un aumento de éste en las células microgliales de las regiones Str y CA1 (* $p < 0,05$, *Ilustración 15 F, H*).

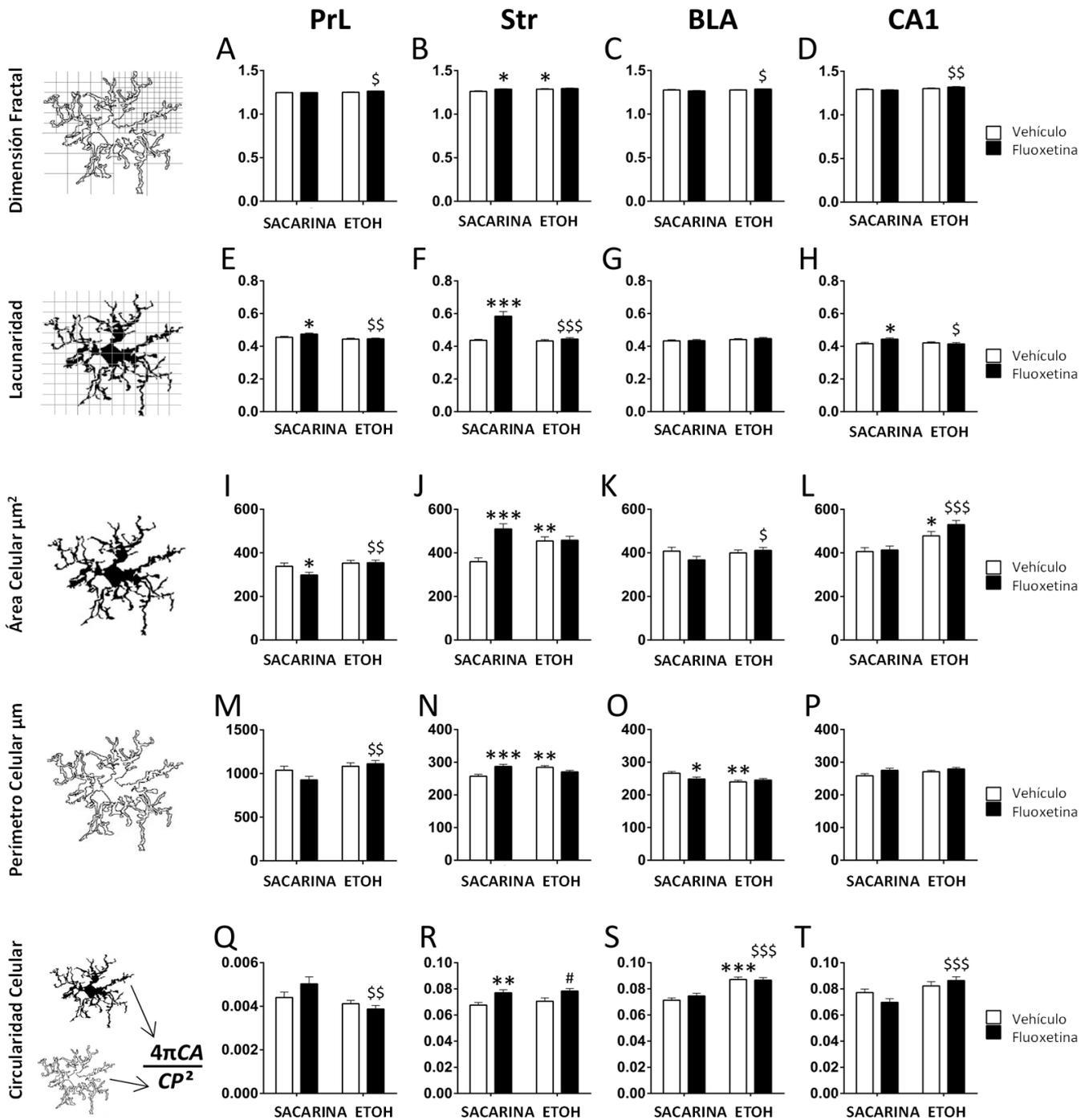
Similar a los descrito en el párrafo anterior, el MSACH experimenta un aumento en el grupo de animales expuestos a etanol y tratados con vehículo (* / ** $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 15 J*). Además, es curioso cómo se repite el patrón del parámetro descrito anteriormente en los mismos grupos y áreas, experimentando una disminución del MSACH de la microglía en los animales expuestos a sacarina y tratados con fluoxetina en PrL (* $p < 0,05$, *Ilustración 15 I*), y un aumento de este parámetro en el Str y el CA1 hipocampal (* / ** $p < 0,05 / 0,01$, *Ilustración 15 J, L*).

RESULTADOS

Respecto al parámetro RCHR, este experimenta una disminución en la microglía hipocampal de CA1 en los grupos de animales expuestos a etanol, tanto si fueron tratados con fluoxetina como en los tratados con vehículo (***/ \$\$ $p < 0,001 / 0,01$, *Ilustración 15 P*). Pudimos observar este mismo patrón por parte de este parámetro morfométrico en la región BLA de los animales tratados con fluoxetina y expuestos a etanol ($p < 0,05$, *Ilustración 15 O*).

Finalmente, el parámetro morfométrico radio medio (MR), se vio afectado al alza en el grupo de animales tratados con vehículo y expuestos a etanol, en las regiones de estudio Str y CA1 hipocampal (* / *** $p < 0,05 / 0,001$, *Ilustración 15 R, T*). En la PrL, también apreciamos dicho aumento en la microglía de los animales expuestos a etanol y tratados con fluoxetina ($p < 0,05$, *Ilustración 15 Q*). No obstante, en las células microgliales de los animales expuestos a sacarina, la fluoxetina ejerció una actividad en el MR de la PrL a la baja, al contrario que en las regiones Str y CA1, donde el MR se ve aumentado (* $p < 0,05$, *Ilustración 15 Q, R, T*).

RESULTADOS



*Ilustración 13 Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre los parámetros morfométricos: dimensión fractal (A – D), lacunaridad (E – H), área celular (I – L), perímetro celular (M – P) y circularidad celular (Q– T) en la microglía de la corteza prelámbica (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el área CA1 del hipocampo (HC). Los histogramas representan la media + SEM (n = 50 células por grupo experimental). Prueba de Tukey: * / ** / *** p <0,05 / 0,01 / 0,001 frente al grupo de sacarina-vehículo; \$ / \$\$ / \$\$\$ p <0,05 / 0,01 / 0,001 frente al grupo sacarina-fluoxetina; # p <0,05 frente al grupo de etanol-vehículo. Fuente adaptada de Aranda J & cols. 2021.*

RESULTADOS

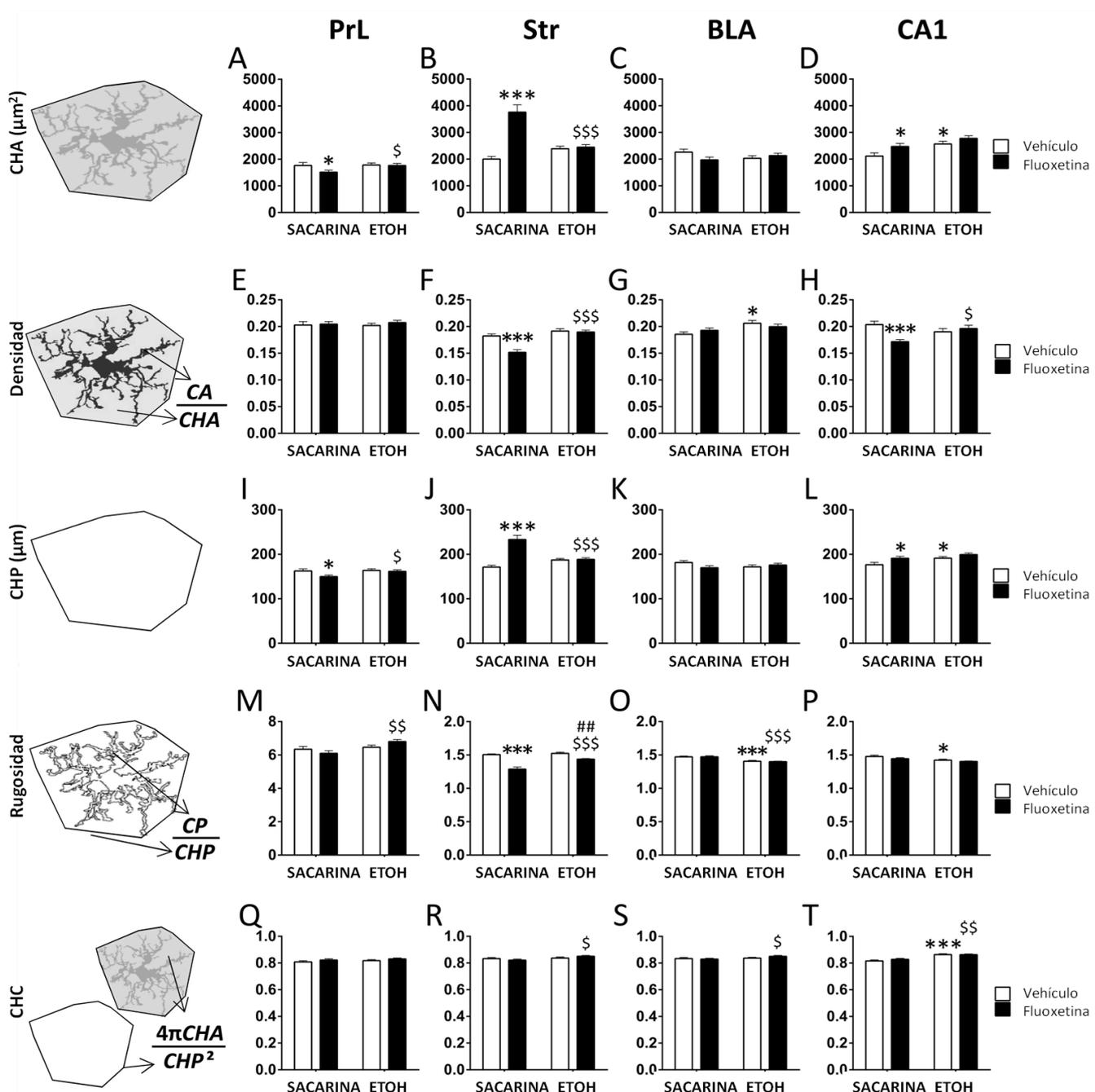
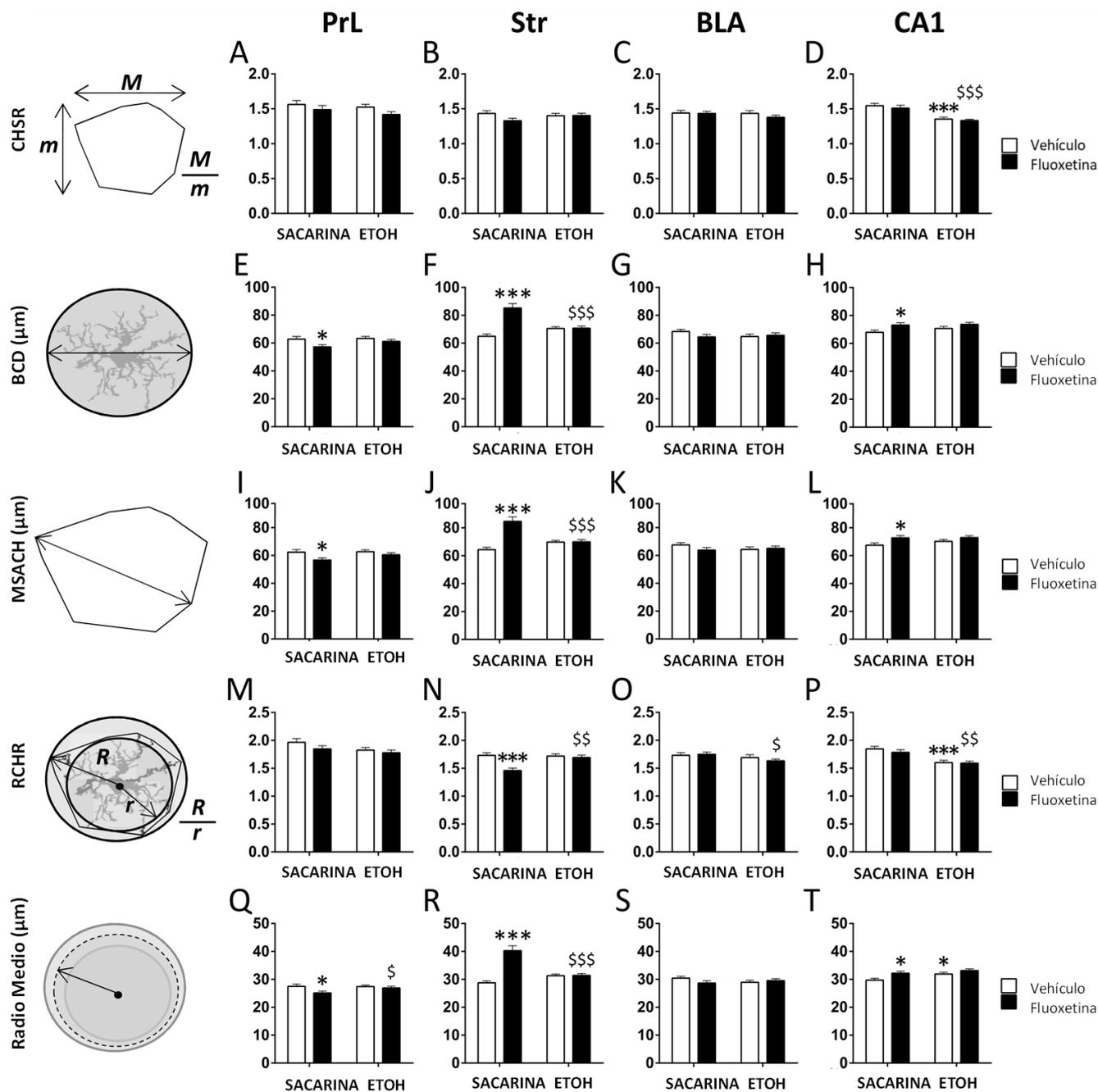


Ilustración 14 Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre los parámetros morfométricos: área de CH (A – D), densidad (E – H), perímetro de CH (I – L), rugosidad (M – P) y circularidad de CH (Q – T) en la microglía de la corteza prelámbica (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo (HC) CA1. Los histogramas representan la media + SEM ($n = 50$ células por grupo experimental). Prueba de Tukey: * / ** / *** $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo de vehículo de sacarina; \$ / \$\$ / \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo sacarina-fluoxetina; # / ### $p < 0,05 / 0,001$ frente al grupo de etanol-vehículo. Fuente adaptada de Aranda J & cols. 2021.

RESULTADOS



*Ilustración 15 Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol en los parámetros morfológicos: Cociente de amplitud de CH (A – D), BCD (E – H), MSACH (I – L), RCHR (M – P) y el radio medio (Q– T) en la microglia de la corteza prefrontal (PrL), el cuerpo estriado (Str), la amígdala basolateral (BLA) y el área CA1 del hipocampo (HC). Los histogramas representan la media + SEM (n = 50 células por grupo experimental). Prueba de Tukey: * / ** / *** p < 0,05 / 0,01 / 0,001 frente al grupo de sacarina-vehículo; \$ / \$\$ / \$\$\$ p < 0,05 / 0,01 / 0,001 frente al grupo sacarina-fluoxetina. Fuente adaptada de Aranda J & cols. 2021.*

RESULTADOS

4. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE LA MORFOLOGÍA MICROGLIAL Y LOS CAMBIOS EJERCIDOS POR LA FLUOXETINA EN LOS PRINCIPALES FACTORES INFLAMATORIOS Y TLR4 EN LAS REGIONES DEL SISTEMA DE RECOMPENSA. CAMBIOS ESPECÍFICOS EN FUNCIÓN DE LA REGIÓN

Tras los análisis correspondientes a la inmunorreactividad de IBA-1, y el análisis morfométrico de la microglía, pudimos observar que el alcohol indujo la mayoría de los cambios producidos en la microglía, y el cese abrupto del tratamiento con fluoxetina produjo cambios morfométricos de forma específica en función de la región. Por ello, nos propusimos evaluar si el autoconsumo de alcohol y/o cese del tratamiento con fluoxetina producido de forma abrupta ejerció algún cambio en la expresión de ARNm de factores inflamatorios, citocinas y quimiocinas, incluido TLR4, en las regiones del sistema de recompensa de interés para el estudio (PrL, Str, BLA y el área CA1 del HC).

Además, nos propusimos evaluar si los cambios ejercidos sobre las características morfométricas de las células microgliales podrían estar, de alguna manera, asociadas a los efectos producidos en la expresión de factores inflamatorios inducidos por la fluoxetina.

RESULTADOS

4.1. CAMBIOS EJERCIDOS POR LA FLUOXETINA EN FACTORES INFLAMATORIOS DEL SISTEMA DE RECOMPENSA

En la PrL, pudimos observar que la fluoxetina redujo la expresión de ARNm de la quimiocina CX3CL1, también denominada fractalquina, a la par que aumentó la expresión de ARNm de las citocinas IL1 β e IL10, en aquellas ratas que fueron expuestas a etanol (* p <0,05, *Ilustración 16 A*).

Respecto al Str, pudimos apreciar solamente cambios en la expresión de ARNm correspondiente al TLR4, el cual se veía aumentado a causa de la fluoxetina, en las ratas expuestas a etanol (* p <0,05, *Ilustración 16 B*).

En la BLA, apreciamos que la fluoxetina redujo la expresión de ARNm de la quimiocina CX3CL1 (como en la PrL), e intensificó la expresión de ARNm de la citocina antiinflamatoria IL4, de las ratas expuestas a etanol (* p <0,05, *Ilustración 16 C*).

El cese en el tratamiento con fluoxetina produjo cambios importantes en el HC. Se observó una disminución de la expresión de ARNm de la quimiocina CX3CL1 (al igual que en PrL y BLA), y un aumento en la expresión de ARNm de la mayoría de las quimiocinas y citocinas objeto de estudio: CXCL12, CCL2, IL1 β , IL6 e IL10. También observamos que la fluoxetina intensificó la expresión de ARNm de BDNF y TLR4 en el HC (* p <0,05, *Ilustración 16 D*), factores que, a excepción de TLR4 en el Str, solamente experimentaron cambios en esta área, en los animales que fueron expuestos a etanol.

RESULTADOS

5. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS MORFOMÉTRICOS DE LA MICROGLÍA Y LA EXPRESIÓN DE ARNm DE FACTORES INFLAMATORIOS EN EL SISTEMA DE RECOMPENSA

Tras observar los cambios ejercidos en la morfología celular de la microglía, y los efectos ejercidos en la expresión de factores inflamatorios en el sistema de recompensa, decidimos analizar si los parámetros morfométricos de las células microgliales se correlacionaban con las modificaciones ejercidas en la expresión de ARNm de los factores inflamatorios inducidos por la fluoxetina.

En la PrL (*Ilustración 16-E*), detectamos que la dimensión fractal, referida a la complejidad espacial que adquiere la célula microglial, se correlacionaba positivamente con la expresión de ARNm de la citocina antiinflamatoria IL10 ($R = 0,67$; $p < 0,009$), a la par que se correlacionaba negativamente con la expresión de ARNm de la quimiocina proinflamatoria CX3CL1 o fractalquina ($R = -0,53$; $p < 0,05$) en los animales expuestos al autoconsumo de alcohol que fueron tratados con fluoxetina.

En el Str, encontramos que el aumento ejercido por la fluoxetina en la expresión de ARNm de TLR4 se correlacionaba específicamente con los valores más altos obtenidos del parámetro morfométrico dimensión fractal de las células microgliales en dicha área ($R = 0,64$; $p < 0,05$, *Ilustración 16-F*)

A su vez, la dimensión fractal se correlacionó con una mayor expresión de ARNm de la citocina antiinflamatoria IL4 ($R = 0,85$; $p = 0,0001$), y una menor expresión de ARNm de las quimiocinas fractalquina ($R = -0,60$; $p < 0,03$) y CCL2 ($R = -0,65$; $p < 0,02$) en la BLA de los animales expuestos a autoconsumo de alcohol que fueron tratados con fluoxetina (*Ilustración 16-G*).

RESULTADOS

Para concluir, pudimos observar que el área celular se correlacionó de forma positiva con los efectos de intensificación ejercidos por la fluoxetina, traducidos en un aumento en la expresión de ARNm de la mayoría de los factores inflamatorios analizados: CXCL12, CCL2, IL1 β , IL6, IL10 y TLR4 ($R > 0,55$; $p < 0,04$). A su vez, este mismo parámetro correlacionó negativamente con la disminución en la expresión de ARNm de fractalquina inducida por fluoxetina ($R = -0,66$; $p < 0,01$), en el HC (*Ilustración 16-H*).

RESULTADOS

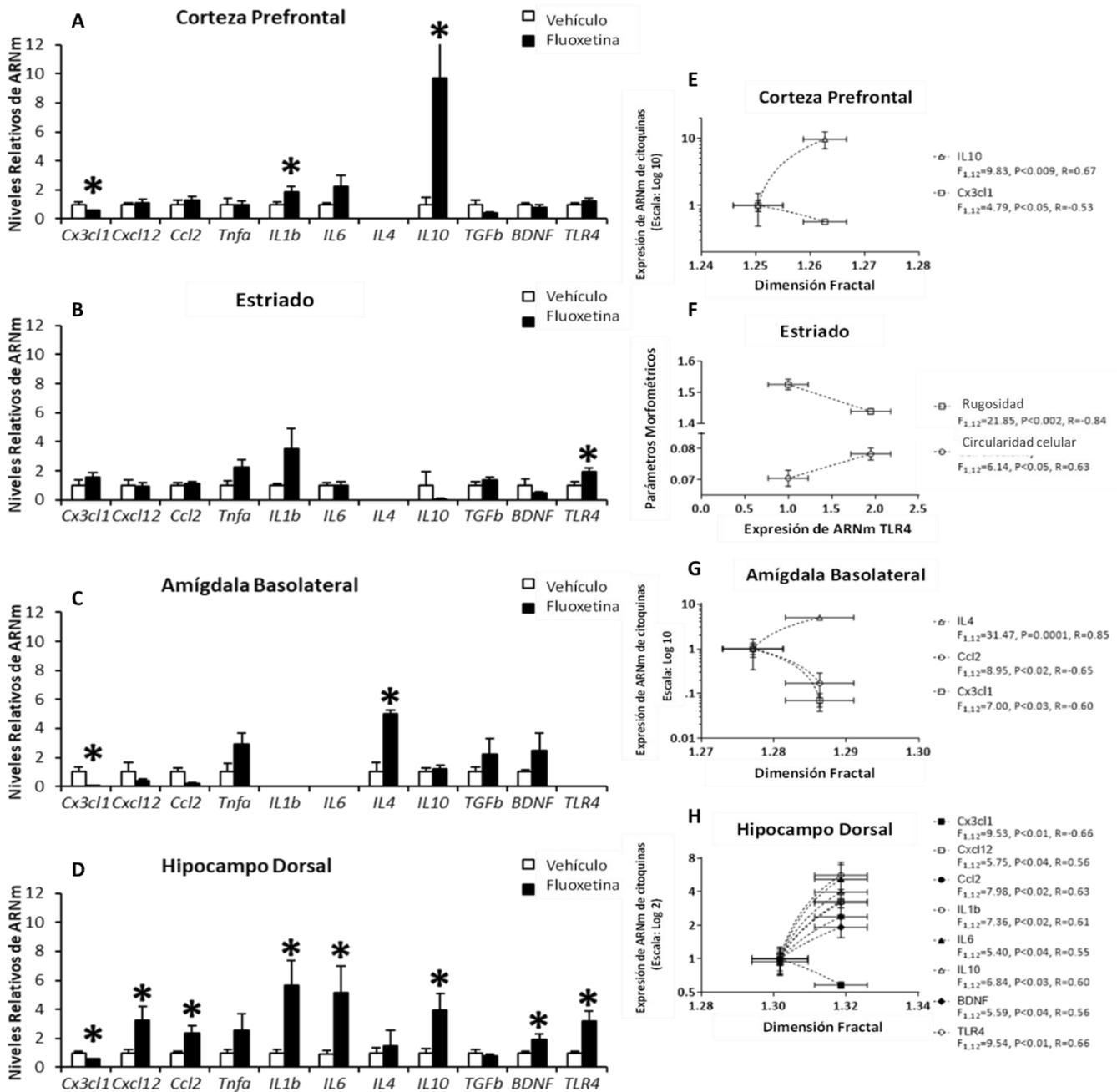


Ilustración 16 Efectos del cese del tratamiento con fluoxetina en ratas con restablecimiento del consumo de etanol sobre la expresión de ARNm de citocinas inflamatorias (*Tnfa*, *IL1β*, *IL6*, *IL4*, *IL10*, *TGFβ*, *BDNF*), quimiocinas (*Cx3cl1*, *Cxcl12*, *Ccl2*) y *TLR4* en la corteza prefrontal (A), cuerpo estriado (B), amígdala basolateral (C) e hipocampo dorsal (D). Los histogramas representan la media + SEM ($n = 7$ ratas por grupo experimental). Prueba *t* de Student: * $p < 0,05$ frente al grupo de vehículo. Análisis de correlación entre factores inflamatorios y parámetros morfométricos de microglía en la corteza preliminar (E), estriado (F), amígdala basolateral (G) e hipocampo dorsal (H) cuando se enfrentaron ratas tratadas con vehículo y ratas tratadas con fluoxetina. Los gráficos de dispersión (XY) representan las medias ± SEM. Las líneas trazadas entre los puntos medios indican que la fluoxetina induce cambios correlativos significativos entre las dos variables representadas. Fuente adaptada de Aranda J & cols. 2021.



RESULTADOS

6. RESULTADOS PRELIMINARES DE LA INMUNOSHISTOQUÍMICA DE QUIMIOCINAS EN REGIONES DEL HIPOCAMPO Y CAMBIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS EN LOS ASTROCITOS DEL CEREBRO – FUTURAS LINEAS DE INVESTIGACION

Se llevó a cabo un análisis preliminar de la expresión inmunohistoquímica en algunas áreas de interés del estudio, concretamente de los receptores de quimiocinas Ccl2/MCP-1 (CCR2), fractalquina/Cx3cl1 (CX3CR1), y Cxcl12/SDF-1 (CXCR4) y del marcador GFAP, para astrocitos y cuantificamos el número de células + para cada receptor y la inmunorreactividad (intensidad).

Respecto a la expresión del receptor CCR2 en las áreas mencionadas, no observamos diferencias significativas entre los animales expuestos a fluoxetina frente a aquellos expuestos a la sustancia vehículo, en aquellas ratas consumidoras de alcohol (Ver *Ilustración 17*).

En relación a la expresión del receptor CX3CR1 para fractalquina, observamos diferencias significativas en la expresión de número de células/mm² en la región CA1 del HC, viéndose reducidas en el grupo de animales tratados con fluoxetina frente a aquellos tratados con vehículo, en ratas consumidoras de etanol (P<0,05) (Ver *Ilustración 18-A*). A su vez, este resultado también coincide con la intensidad de la inmunorreactividad de las células en dicha área (P<0,05) pertenecientes al mismo grupo de animales (ratas consumidoras de alcohol tratadas con fluoxetina frente a ratas consumidoras de etanol y tratadas con vehículo (Ver *Ilustración 18-C*)). En el área giro dentado del HC, también observamos una disminución estadísticamente significativa (P<0,05) en la inmunorreactividad de las células que expresan el receptor CX3CR1 en animales expuestos a etanol y fluoxetina frente a aquellos expuestos a etanol y vehículo (Ver *Ilustración 18-C*). No observamos cambios relevantes en las áreas correspondientes a Str

RESULTADOS

ni BLA ni en el número de células ni en la inmunorreactividad de la prueba para la expresión de CX3CR1 (Ver *Ilustración 18- B y D*).

Observamos que la prueba inmunohistoquímica de la expresión del receptor CXCR4 obtuvo un mayor número de resultados en comparación con el resto de receptores de quimiocinas para este experimento. En relación a las regiones del HC, pudimos observar cómo en animales expuestos a etanol y fluoxetina, la región correspondiente a CA3, experimentó un aumento en el número de células/mm² (P<0,05), mientras que la región CA1 disminuyó de forma muy significativa (P<0,001) el número de células/ mm², frente a aquellos animales que consumieron etanol y fueron expuestos a vehículo (Ver *Ilustración 19-A*). Sin embargo, al observar la inmunorreactividad de dicho receptor, pudimos apreciar que el giro dentado disminuyó su inmunorreactividad de forma altamente significativa (P<0,001), mientras que esta área no experimentó cambios en el número de células/mm² al comparar las ratas expuestas a consumo de etanol y fluoxetina frente a las expuestas a etanol y vehículo (Ver *Ilustración 19-C*). A su vez, a pesar de los cambios producidos en el número de células/mm² de las áreas CA3 y CA1, al observar los cambios producidos en la inmunorreactividad de la expresión de CXCR4 en dichas áreas, el área CA3 experimentó una disminución de la misma en animales expuestos a consumo de etanol y tratados con fluoxetina (P<0,05), mientras que el área CA1 no experimentó cambios significativos en la inmunorreactividad (Ver *Ilustración 19-C*).

En relación a la región Str no observamos diferencias significativas en la expresión inmunohistoquímica del receptor CXCR4 (ni en el número de células/mm² ni en la inmunorreactividad) entre los grupos de estudio (Ver *Ilustración 19-B y D*).

En la región correspondiente a la BLA pudimos observar cómo el número de células/mm² disminuyó de forma muy significativa (P<0,001) en animales consumidores de etanol y

RESULTADOS

tratados con fluoxetina frente a aquellos que consumieron etanol y tratados con vehículo (Ver *Ilustración 19-B*). Sin embargo, no observamos cambios significativos en la inmunorreactividad de la expresión inmunohistoquímica del receptor CXCR4 en dicha región (Ver *Ilustración 19-D*).

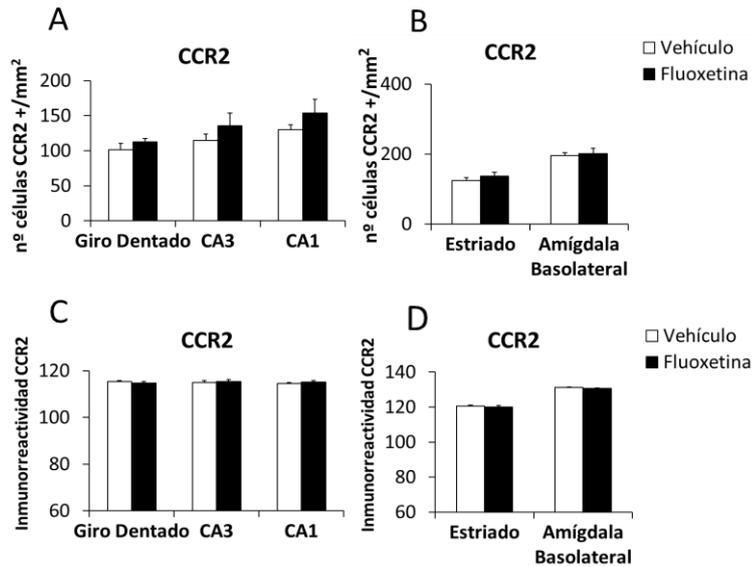
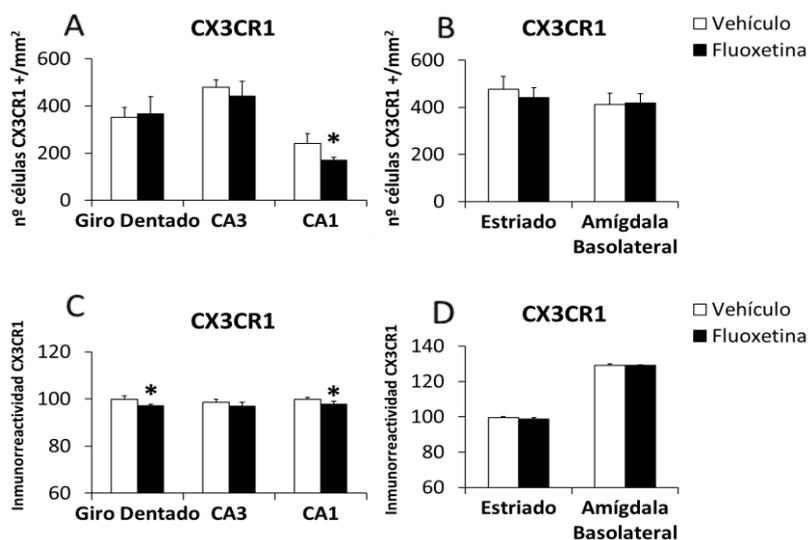
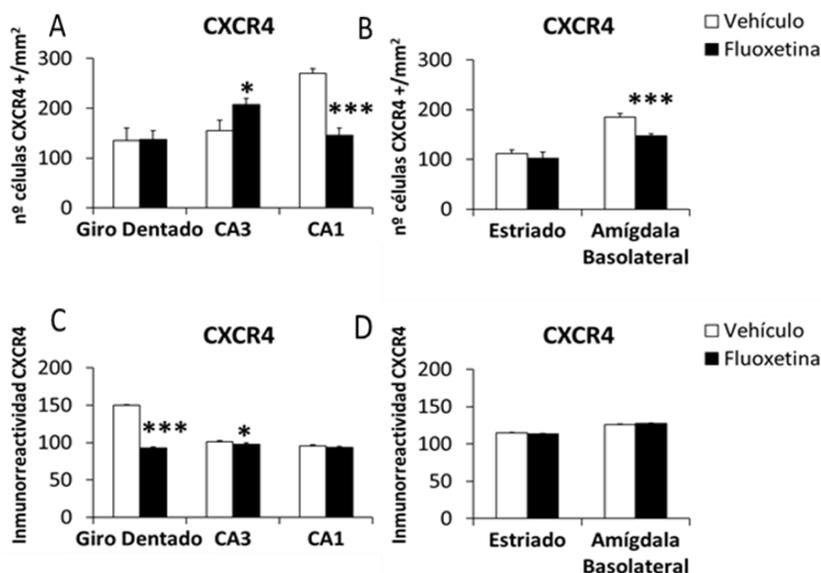


Ilustración 17 Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor CCR2 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateral de cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. Los histogramas representan la Media \pm SEM. Test T de Student. ($n=8$ secciones*3regiones*4grupos; $n=96$).

RESULTADOS



*Ilustración 18 Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor de fractalquina/CX3CR1 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateral de cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. Los histogramas representan la Media \pm SEM. Test T de Student: * $P < 0,05$. (n=8 secciones*3regiones*4grupos; n=96)*



*Ilustración 189 Resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica del receptor CXCR4 en las áreas giro dentado, CA3, CA1, estriado y amígdala basolateral de cerebros de ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. Los histogramas representan la Media \pm SEM. Test T de Student: * $P < 0,05$.; *** $P < 0,001$. (n=8 secciones*3regiones*4grupos; n=96).*

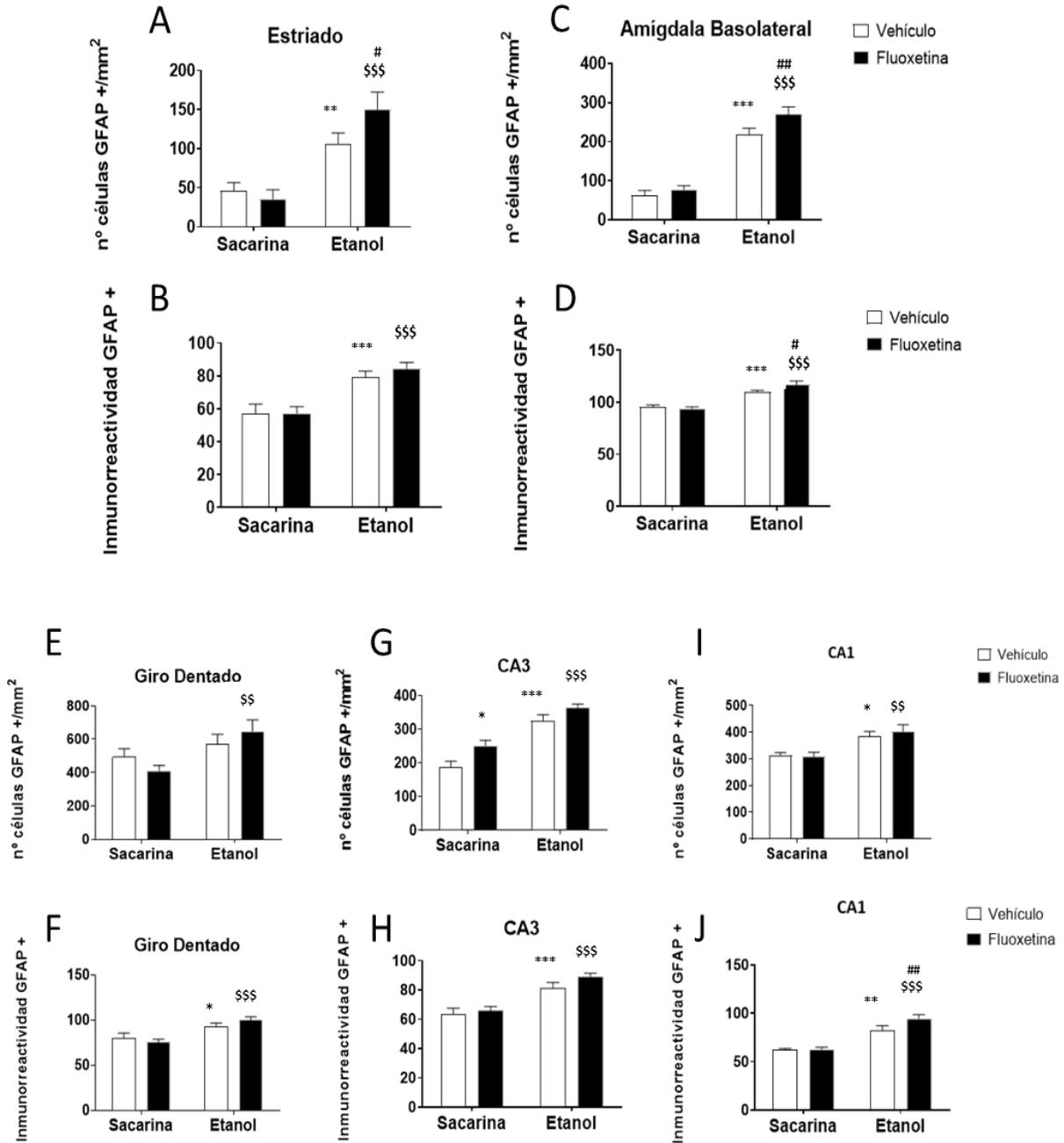
RESULTADOS

En los resultados preliminares de la expresión inmunohistoquímica para GFAP observamos un efecto del autoconsumo de etanol en todas las regiones hasta el momento analizadas, tanto en el número de células /mm²: DG ($F_{1,18} = 8,976$; $p = 0,0078$); CA3 ($F_{1,18} = 76,32$; $p < 0,0001$), CA1 ($F_{1,18} = 17,16$; $p = 0,0006$) (*Ilustración 20-E,G,I*, respectivamente), Str ($F_{1,18} = 37,15$; $p < 0,0001$) (*Ilustración 20-A*) y BLA ($F_{1,18} = 124,7$; $p < 0,0001$) (*Ilustración 20-C*); como en la inmunorreactividad (intensidad): DG ($F_{1,18} = 19,69$; $p = 0,0003$), CA3 ($F_{1,18} = 40,18$; $p < 0,0001$), CA1 ($F_{1,18} = 50,35$; $p < 0,0001$) (*Ilustración 20-F,H,J*, respectivamente), Str ($F_{1,18} = 49,64$; $p < 0,0001$) (*Ilustración 20-B*) y BLA ($F_{1,18} = 61,77$; $p < 0,0001$) (*Ilustración 20-D*) para GFAP, en ratas expuestas a etanol (* / ** / *** $p < 0,05$ / $p < 0,01$ / $p < 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina) como en ratas expuestas a etanol y tratadas con fluoxetina (\$ / \$\$\$ $p < 0,01$ / $p < 0,001$ frente a ratas expuestas a sacarina tratadas con fluoxetina). También pudimos observar un aumento tanto en el número de células /mm² como en la inmunorreactividad en las regiones CA1 del HC (*Ilustración 20-I y J*) y la BLA (*Ilustración 20-C y D*) en ratas expuestas a etanol y tratadas con fluoxetina (# / ## $p < 0,05$ / $p < 0,001$) frente a ratas expuestas a consumo de etanol y vehículo (*Ilustración 20 A-J*).

También pudimos observar efecto del tratamiento antidepresivo fluoxetina en la inmunorreactividad del área CA1 hipocampal ($F_{1,18} = 4,141$; $p = 0,0569$) (*Ilustración 20-J*), y en el número de células /mm² del área CA3 hipocampal ($F_{1,18} = 10,47$; $p = 0,0046$) (*Ilustración 20-G*) y la BLA ($F_{1,18} = 5,803$; $p = 0,0269$) (*Ilustración 20-C*) en ratas expuestas a consumo de etanol y tratamiento antidepresivo frente a ratas expuestas a consumo de sacarina y tratamiento antidepresivo (\$ / \$\$ $p < 0,05$ / $p < 0,01$).

No observamos interacción entre en consumo de etanol y el tratamiento de fluoxetina en ninguna de las regiones analizadas.

RESULTADOS



*Ilustración 19 Resultados Preliminares de la prueba inmunohistoquímica GFAP en las áreas cerebrales estudiadas en el experimento en ratas expuestas al autoconsumo de alcohol. Los histogramas representan la Media \pm SEM. Prueba de Tukey: * / ** / *** $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo de sacarina-vehículo; \$ / \$\$ / \$\$\$ $p < 0,05 / 0,01 / 0,001$ frente al grupo sacarina-fluoxetina; # $p < 0,05$ / ## $p < 0,01$ frente al grupo de etanol-vehículo. ($n=8$ secciones*3regiones*4grupos; $n=96$).*

V. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El trastorno por uso de alcohol (TUA) produce una serie de cambios en el sistema inmune periférico y a nivel del SNC, provocando consecuentemente secuelas neuroinmunes relacionadas con la alteración en la expresión de genes y circuitos nerviosos involucrados en los procesos de neuroinflamación, estrechamente relacionados con la aparición de trastornos nerviosos como la depresión (179,180). Un elemento clave en la comprensión de este fenómeno reside en la actividad proinflamatoria que ejerce el alcohol a través de la activación directa de TLR4 en las células gliales, promoviendo la producción de mediadores inflamatorios y la muerte celular en el cerebro (106).

A pesar de las investigaciones llevadas a cabo durante las últimas décadas con respecto al uso de fármacos antidepresivos, como los ISRS, en el trastorno de uso por sustancias como el TUA, esta elección terapéutica sigue siendo un tema de debate (181). La premisa acerca de las propiedades farmacológicas antiinflamatorias concedidas a los antidepresivos ISRS ha fomentado su prescripción de forma rutinaria en este tipo de trastornos (81,182,183). Sin embargo, siguen existiendo discrepancias en relación a las características antiinflamatorias y proinflamatorias que reúne este grupo de terapias farmacológicas, por ejemplo, en función de si existe un factor estresor y/o la forma de administración y tipo de consumo de la sustancia de abuso (81,182,183,184).

En este estudio nos propusimos evaluar los efectos inflamatorios producidos en la morfología de las células microgliales y el fenotipo reactivo de estas al restablecer el consumo de alcohol durante tres semanas, en un modelo experimental basado en el aumento de la ingesta de alcohol, derivado del cese abrupto del tratamiento con fluoxetina (10 mg/kg/día) durante el período de privación de autoadministración de alcohol (14 días), en un modelo crónico de autoconsumo de alcohol en ratas Wistar. Los animales

DISCUSIÓN

que no fueron expuestos a alcohol, fueron expuestos al autoconsumo de sacarina, y recibieron el mismo patrón de tratamiento que los sujetos expuestos al consumo de alcohol, siendo empleados como grupo control del experimento.

La IBA-1 es una proteína de unión específica para el calcio de la microglía, que participa en la remodelación del citoesqueleto de la microglía y es inducida por procesos inflamatorios. Su función principal consiste en la conversión de la morfología de estas células hacia un fenotipo reactivo y, por tanto, sirve como marcador inmunohistoquímico del estado reactivo de la microglía (185). En los hallazgos obtenidos de nuestro estudio, pudimos observar cómo el restablecimiento del autoconsumo de alcohol incrementó la inmunorreactividad cerebral para IBA-1 en todas las regiones del cerebro de interés analizadas.

El aumento en la expresión inmunohistoquímica de IBA-1 producido por el alcohol en las áreas de estudio está asociado con los cambios observados en la morfología microglial, un fenómeno que probablemente represente un estado activado de la microglía. En relación a este hallazgo, se observaron diferencias en los principales parámetros morfométricos de la microglía (dimensión fractal, lacunaridad, densidad, rugosidad, área celular, perímetro y circularidad) de forma específica en cada región del cerebro estudiada (Ver Ilustración 21). El área CA1 del HC y el Str fueron las regiones de estudio en las que observamos que las células microgliales experimentaban una mayor variación de su morfología en relación a su complejidad espacial, el número de ramificaciones y la superficie del perímetro celular. Estos datos revelan una caracterización de estado ramificado de la microglía inducido por la reinstauración del consumo de alcohol.

El cese del tratamiento con fluoxetina no obtuvo un efecto tan notable sobre la inmunorreactividad de IBA-1, ni en los animales expuestos a alcohol ni en aquellos

DISCUSIÓN

expuestos a sacarina. Sin embargo, a la hora de analizar los parámetros morfológicos más sensibles a los cambios sutiles producidos en la microglía (dimensión fractal, lacunaridad, área celular, circularidad, densidad y rugosidad), pudimos observar como la interrupción del tratamiento generó un morfotipo de microglía hiperramificada de tipo reactivo en el Str y el área CA1 del HC (Ver Ilustración 21).

Concretamente, el área CA1 del HC experimentó un aumento del área celular, por tanto, un aumento de las ramificaciones y/o agrandamiento del soma, y una disminución en la circularidad celular (Ver Ilustración 21). Esta serie de modificaciones morfológicas podrían dar respuesta a los aumentos en la ingesta de alcohol que se generó tras la interrupción de la administración de fluoxetina (84,174), apoyándonos en la supuesta hipótesis de que la microglía en estado activado es un componente fundamental a la hora de remodelar la sinapsis responsable de las conductas mejoradas de búsqueda y/o consumo de alcohol para reajustar los circuitos motivacionales y cognitivos involucrados en la ingesta de alcohol. Sin embargo, es necesario un mayor número de investigaciones al respecto para contrastarlo.

Existe evidencia acerca de los efectos que produce la exposición al consumo de alcohol en el proceso de activación microglial en diferentes modelos animales, en función de variables de gran relevancia, como son el tipo de consumo: crónico, intermitente y compulsivo; el tiempo de consumo: días, semanas y meses; y la edad de los animales: roedores adultos y recién nacidos. Los resultados de estas investigaciones nos muestran que la expresión génica o proteica del marcador microglial IBA-1 está incrementada en las áreas del cerebro HC y corteza cerebral (174,186,187,188,189). De acuerdo a la evidencia previa y en base a nuestros resultados, también podemos observar que este aumento en la expresión inmunohistoquímica de IBA-1 se produce en la PrL, el Str, la

DISCUSIÓN

BLA y el HC en ratas que fueron re-expuestas al consumo de alcohol tras un período de abstinencia.

De acuerdo a estudios previos que emplearon modelos animales similares en relación a la exposición del consumo de alcohol, los cambios producidos en la morfología microglial del cerebro (hipocampo, corteza, cuerpo caloso, cerebelo), como consecuencia del consumo de alcohol, caracteriza a estas células con procesos celulares cortos, gruesos y en poca cantidad, además de un soma de gran tamaño y forma irregular (Ver Ilustración 21) (187,188,190,191,192,193,194,195).

El estado natural de la microglía correspondiente a un cerebro sano varía en función de la región cerebral y el tipo de sinapsis generado por una exposición medioambiental determinada. Sin embargo, se desconoce el funcionamiento exacto de los mecanismos responsables de dichas diferencias morfológicas. La naturaleza activada de las células microgliales en reposo, al estar en contacto continuo con las sinapsis de neuronas y otras células del sistema nervioso central, se caracterizan por una gran cantidad de procesos celulares delgados y ramificados, con movimientos dinámicos para comprobar el entorno extracelular y poder así identificar posibles daños o amenazas (Ver Ilustración 21) (100).

Por otra parte, cuando estas células reconocen la existencia de una amenaza ante señales patológicas (como la liberación de citocinas y radicales libres) producidas por patógenos, daño neuronal o inflamación, adquieren un estado hiperramificado con multitud de ramificaciones secundarias y una rápida capacidad de cambio en la longitud del proceso y su reorientación hacia la lesión reconocida (196).

Finalmente, cuando la microglía se encuentra en un estado de activación completa, ésta adquiere unos procesos cortos y aumenta el grosor de los mismos, además de

DISCUSIÓN

experimentar un aumento en el tamaño del soma, adquiriendo una apariencia ameboide (197,198).

En esta investigación, se llevó a cabo un análisis cuantitativo minucioso de varios parámetros morfométricos capaces de discriminar hasta las mínimas diferencias de las diferentes modificaciones que experimentaban la morfología de las células microgliales en sus diferentes estados de activación. Entre los parámetros más destacables a la hora de diferenciar dichos cambios, incluimos la complejidad espacial que adquirirían las células (dimensión fractal), la heterogeneidad intercelular (lacunaridad), el área celular, el perímetro y la circularidad, y el grosor y capacidad de retracción (determinados por los parámetros de rugosidad y densidad) en los patrones de ramificación de los procesos microgliales (Ver Ilustración 21).

Concretamente, pudimos observar que la dimensión fractal nos proporciona información muy útil, pero difícilmente de apreciar mediante otros parámetros, en la morfología celular de la microglía (Ver Ilustración 21), por ejemplo, en respuesta a una lesión difusa o leve que produzca cambios mínimos y dinámicos en las mismas (199). De hecho, al tratarse de un sistema de reconocimiento del medio nervioso, es importante destacar que los mínimos cambios generados en la respuesta fenotípica y morfológica de estas células, podrían ayudarnos a aumentar los conocimientos acerca del sistema inmune innato, puesto que la mínima expresión de cambio, podría generar una serie de respuestas, a la larga, destacables en el comportamiento del SNC (100,197,198). De hecho, estudios previos nos muestran como la microglía no es solo relevante en procesos de daño o amenaza en el cerebro, sino también en respuesta a las posibles modificaciones en la sinapsis celular y la modulación de ésta (196). De ahí nuestro interés por estudiar el cambio que genera la actividad microglial en base a su respuesta con el medio cerebral, puesto que se ha demostrado que el cambio generado a nivel morfológico está relacionado

DISCUSIÓN

con un cambio en la función de las células cerebrales. En el supuesto caso de que se genere un daño, la célula microglial alarga los procesos celulares con el fin de reconocer el cambio o daño que se produce e incluso en situaciones de mayor gravedad, generar un movimiento del soma celular y la liberación de sustancias involucradas en la neuroinflamación, como las citocinas y las quimiocinas, las cuales, junto a los astrocitos, ejercen un papel esencial en la modificación morfológica microglial (Ver Ilustración 17 y 21) (200,201).

En este estudio, el análisis de la morfología microglial nos mostró como el restablecimiento del consumo de alcohol incrementó los valores relacionados con la complejidad y el engrosamiento de los procesos microgliales de las regiones CA1 del HC y el Str, a la par que reducía la heterogeneidad celular de las células microgliales (se reducía el espacio existente entre los procesos celulares de las células y entre sus propias ramificaciones) correspondientes a la PrL y la región CA1 del HC, sugiriéndonos un estado de la microglía activado (Ver Ilustración 21).

Se conoce como la microglía activada guarda asociación con una mayor expresión de receptores inmunes innatos de tipo toll (pertenecientes a la familia de PPRs) y la secreción de factores inflamatorios tanto neurotóxicos como neuroprotectores, de tal forma que las señalizaciones producidas por estas moléculas promueven la proliferación y migración de células neuroinmunes con la finalidad de crear una respuesta inmune específica de cada región del cerebro (202,203,204).

Los receptores tipo toll activan cascadas de señalización que convergen en el NF-kB, un factor de transcripción nuclear en el sistema inmune innato que fomenta la producción de citocinas proinflamatorias, como las interleucinas IL1 β , IL6, TNF α y TGF β . A su vez, la microglía activada también ordena la señalización de factores antiinflamatorios como las

DISCUSIÓN

interleucinas IL4, IL10 y BDNF, de tal forma que crean una red de señalizaciones moduladoras ideales para la respuesta inflamatoria homeostática ante un daño, mediante la eliminación de los patógenos o de las células apoptóticas (190,205).

Sin embargo, la exposición al alcohol, y otras drogas, generan un estado de activación continua de la microglía, generando un desequilibrio en la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias y/o una continua y creciente producción de citocinas proinflamatorias que pueden contribuir a la generación de estados patológicos, como el TUA (202,206,207).

El consumo de drogas, como el alcohol, deriva en trastornos caracterizados por cambios en la conducta y disfunción cognitiva del individuo, pero el más prevalente en pacientes con TUA, en cuanto a comorbilidad se refiere, es la depresión (208). Es por tanto de especial relevancia destacar que, a nivel del SNC, tanto la hiperactivación del sistema neuroinmune como de los mecanismos en los que se encuentra involucrada la microglía, en los procesos neuroinflamatorios producidos por el alcohol, desempeña una función esencial en los trastornos de depresión mayor (209,210). De hecho, tanto en pacientes con depresión mayor (209,211) como en modelos animales de depresión (212,213) la expresión del marcador microglial IBA-1 y de citocinas inflamatorias como IL1 β , TNF α , BDNF se encuentran reguladas positivamente. Por tanto, cabe pensar en la hipótesis del control que puede ejercer el tratamiento con antidepresivos en el control de la inflamación, independientemente de que exista una supuesta asociación entre la existencia de inflamación y la susceptibilidad de desarrollar depresión (113). Sin embargo, varios estudios contrarrestan la posibilidad de dicha hipótesis, al demostrar que los antidepresivos ISRS convencionales no responden a las inmunoterapias que involucran el trastorno depresivo, ni tampoco ejercen efectos antiinflamatorios o proinflamatorios (184,212,214,215,216,217). En base a esta premisa, existen estudios que

DISCUSIÓN

plantean la hipótesis de que la interacción entre los ISRS y la calidad de las condiciones ambientales podrían justificar las variaciones en la disparidad de efectos que ejercen en la respuesta inflamatoria el tratamiento con ISRS (182,183,218,219,220,221).

La elección de la fluoxetina como tratamiento de interés para este estudio se fundamenta en que, frente al amplio margen de acción terapéutica en los TUA, los antidepresivos del tipo ISRS constituyen una estrategia farmacológica contra la depresión justificando su empleo en base a la restitución de la señalización serotoninérgica, como se describe en el estudio de Coupland & cols. (74). A pesar de que los fármacos antidepresivos, como la fluoxetina o similares, son capaces de reducir los síntomas clínicos de la abstinencia alcohólica (hiperactividad, ansiedad, estado del ánimo negativo), todavía no han mostrado tener la suficiente eficacia durante el consumo y recaída. Investigaciones previas de nuestro grupo de investigación (84,174), han demostrado como el cese abrupto de fluoxetina produce una escalada en el consumo de alcohol en modelos experimentales de autoconsumo (137).

Es de especial importancia destacar el análisis preliminar realizado del marcador de astrocitos GFAP, a la hora de entender determinados resultados obtenidos en este experimento. En términos generales, pudimos observar como las regiones correspondientes al HC (CA3 y CA1) y la BLA reaccionaban de forma particular en el análisis inmunohistoquímico, tanto en el efecto que ejerció el factor alcohol como el tratamiento antidepresivo (Ver Ilustración 21). Se conoce como la BLA y sus conexiones con el Str, están estrechamente relacionadas con el comportamiento de búsqueda de recompensa en el consumo de sustancias adictivas, concretamente en el TUA (84,174,222). A su vez, dado el creciente interés por el rol que desempeña el sistema neuroinmune en los trastornos por uso de sustancias, y la homeostasis particular de los astrocitos con las células microgliales, se ha llegado a postular como hipotética diana

DISCUSIÓN

terapéutica dicho sistema neuroinmune, dada su conexión con los sistemas y circuitos neuronales involucrados en el paradigma de la adicción y la neuroinflamación (sistema glutamatérgico, gabaérgico, serotoninérgico, endocannabinoide, entre otros), concretamente en procesos crónicos de dependencia. A su vez, los resultados obtenidos en las áreas hipocampales CA3 y CA1, principales nichos neurogénicos, y el conocimiento generado en base a la actividad de las drogas de abuso en los cambios de neuroplasticidad en el SNC, como el alcohol, nos sugieren un circuito de retroalimentación entre los astrocitos y las células microgliales, señalando al sistema neuroinmune como precursor de los cambios producidos a través de una producción desregularizada de citocinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias que afectan a la neurogénesis y neuroplasticidad del cerebro (223,224). Estos resultados preliminares, junto a las pruebas inmunohistoquímicas de los receptores de quimiocinas CCR2, CXCR4 y CX3CR1 podrían servir de ejemplo de dicho proceso de desregularización, generado por el consumo crónico y la recaída, probablemente potenciados por el efecto que genera el tratamiento antidepresivo fluoxetina y su cese abrupto, en las áreas mencionadas.

De acuerdo a lo descrito, nuestros resultados sobre la morfología microglial nos mostraron como el cese del tratamiento con fluoxetina produjo cambios sutiles en los principales parámetros morfométricos, reflejados en una mayor complejidad espacial (dimensión fractal) y una menor heterogeneidad entre células (lacunaridad) (Ver Ilustración 21). A su vez, también generó un mayor engrosamiento y una retracción de los procesos celulares (traducidos en los parámetros de densidad y rugosidad), principalmente en las regiones del Str y CA1 del HC. En su conjunto, estas modificaciones morfológicas podrían indicar un incremento en la ramificación y la complejidad de los procesos microgliales que estaría estrechamente asociado a la

DISCUSIÓN

representación de un estado reactivo hiperramificado de la microglía asociado al cese del tratamiento con fluoxetina (Ver Ilustración 21). Como consecuencia, esta reacción podría suponer un comportamiento microglial funcionalmente hiperactivo por parte de la microglía inducido por la exposición al ambiente nervioso generado por el consumo de alcohol.

A su vez, este experimento también vislumbró cómo la recaída al consumo de alcohol fomentaba un desequilibrio en la respuesta inflamatoria de los antidepresivos ISRS tras su cese de administración, que coincidía con un período de abstinencia alcohólica. De acuerdo a lo descrito, nuestros resultados indicaban cómo el cese del tratamiento con fluoxetina en ratas que se les había reestablecido el consumo de alcohol, se asociaba con modificaciones en la expresión de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias, como *Tnfa*, *Il1 β* , *Il6*, *Il4*, *Il10*, *Tgf β* , *Bdnf*. A su vez, también pudimos observar este tipo de modificaciones en la expresión de quimiocinas como *Cx3cl1*, *Cxcl12* y *Ccl2*, y en la expresión del gen correspondiente a *TLR4*, como en las pruebas inmunohistoquímicas de los receptores de dichas quimiocinas (CX3CR1 y CXCR4), y del marcador de astrocitos GFAP. Todas estas modificaciones en la expresión de factores proinflamatorios y antiinflamatorios fueron, a su vez, establecidos de una forma específica dependiente de la región del cerebro observada (Ver Ilustración 17 y 21). Sin embargo, el HC fue la región con la respuesta neuroinmune más significativa. Esta misiva nos sugiere que al tratarse de un área de especial relevancia en cuanto a su función como nicho de neurogénesis, y su papel adaptativo a lo largo de la historia de la evolución de las especies, sin apenas modificaciones relevantes en su estructura, la convierte en una sección del cerebro con características neuroplásticas específicas y, posiblemente, de especial relevancia como diana de observación y tratamiento debido a su sensibilidad frente a

DISCUSIÓN

modificaciones generadas por procesos inflamatorios, como son los generados por las sustancias de abuso, y específicamente en nuestro caso por el alcohol (222,223,224).

Nos resultó de especial interés cómo la expresión de ARNm de la quimiocina proinflamatoria *Cx3cl1* (fractalquina) se vio reducida en las regiones PrL, BLA y HC en aquellas ratas expuestas al consumo crónico de alcohol, que experimentaron una interrupción abrupta del tratamiento con fluoxetina. De entre todas las quimiocinas, la fractalquina (regulada por astrocitos en procesos crónicos de inflamación) (225) y su receptor CX3CR1 (principalmente localizado en células microgliales y astrocitos) (226) constituyen un sistema endógeno de acción antiinflamatoria en el SNC a la hora de modificar ciertos estados de activación de la microglía (166). Sin embargo, en un escenario de inflamación, como es el generado por el alcohol, si este sistema se encuentra de alguna manera inhibido por la acción del tratamiento ISRS, podría sugerirnos que el tratamiento antidepresivo está produciendo un efecto secundario o colateral de supresión de las barreras de defensa del propio SNC frente al daño que se genera en este. Paralelamente, pudimos apreciar en este mismo grupo experimental, como la expresión de ARNm de *Tlr4* se incrementaba en el HC y el Str. Estos resultados nos hicieron plantearnos si los cambios generados por el tratamiento antidepresivo en los factores inflamatorios y TLR4 podrían guardar relación con las modificaciones morfológicas de la microglía.

En el experimento observamos una expresión de ARNm alterada en la mayoría de los factores inflamatorios que se correlaciona estrechamente con aumentos en el parámetro morfométrico dimensión fractal (D), inducidos por el tratamiento fluoxetina. La dimensión fractal es un parámetro morfológico altamente sensible que nos representa la ramificación secundaria y el reajuste de los procesos microgliales, que se traduce en la complejidad espacial que adquiere la microglía (Ilustración 14), una característica

DISCUSIÓN

funcional de la microglía activada que se observa ante un estado hiperramificado de la misma (196). A su vez, de acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior, pudimos observar como la disminución en los niveles de ARNm de *Cx3cl1*, inducido por la fluoxetina, se correlaciona con el parámetro dimensión fractal en PrL y BLA, y con el parámetro área celular de las células microgliales (que nos informa acerca de la actividad de ramificación del proceso microglial) en el HC de las ratas expuestas a etanol (Ver Ilustración 21). Esta asociación inversa dada entre la expresión de *Cx3cl1* y los parámetros de complejidad espacial y el área celular de la microglía concuerdan con la función de la señalización de *Cx3cl1* en la remodelación de la sinapsis mediada por la microglía, recientemente conocida por Gunner & Cols. (227) y su consecuente manifestación en el comportamiento cognitivo, el cual se ve mermado en ratones que adolecen del gen *Cx3cl1* (228).

También pudimos observar cómo se correlacionaban el área de las células microgliales con los aumentos en las quimiocinas *Cxcl12* y *Ccl2* y la mayoría de citocinas inflamatorias *Il1 β* , *Il6*, *Il10* en el HC, aumentos generados por el tratamiento antidepresivo fluoxetina. Además, en esta región también apreciamos cómo este parámetro morfométrico se correlacionaba positivamente con la expresión de ARNm de *Tlr4*, como podemos observar en la Ilustraciones 17 y 21. También es de particular importancia destacar la correlación específica dada entre los aumentos de ARNm correspondientes a *Tlr4* en el Str, inducidos por la fluoxetina, y el aumento en el parámetro morfométrico dimensión fractal (D). Estos datos respaldan resultados de investigaciones anteriores que abordan la función que desempeñan los receptores TLR4 en las interacciones entre neuronas y células microgliales, sobretodo en las conexiones sinápticas establecidas por el consumo de alcohol (229).

Centrándonos en estos datos, y en relación al comportamiento del consumo de alcohol que experimentan estos animales, cabe pensar en la casuística que guardan los cambios

DISCUSIÓN

en la morfología y el fenotipo reactivo de la microglía (experimentados por la expresión específica del etanol de TLR4 y la consecuente señalización de factores inflamatorios y quimioatrayentes), como factor clave a la hora de explicar el aumento en el consumo de alcohol inducido por el tratamiento fluoxetina, tal y como describió nuestro equipo de investigación en publicaciones previas (84,174). Dada esta prometedora hipótesis, es de destacar la necesidad de un mayor número de investigaciones que abarquen el efecto que ejercen los antidepresivos ISRS sobre la morfología microglial en relación a la señalización inflamatoria mediada por el TLR4 en el HC, y su papel en la remodelación de los neurocircuitos, como elemento clave para la comprensión del deterioro cognitivo inducido por el consumo de alcohol a largo plazo.

DISCUSIÓN

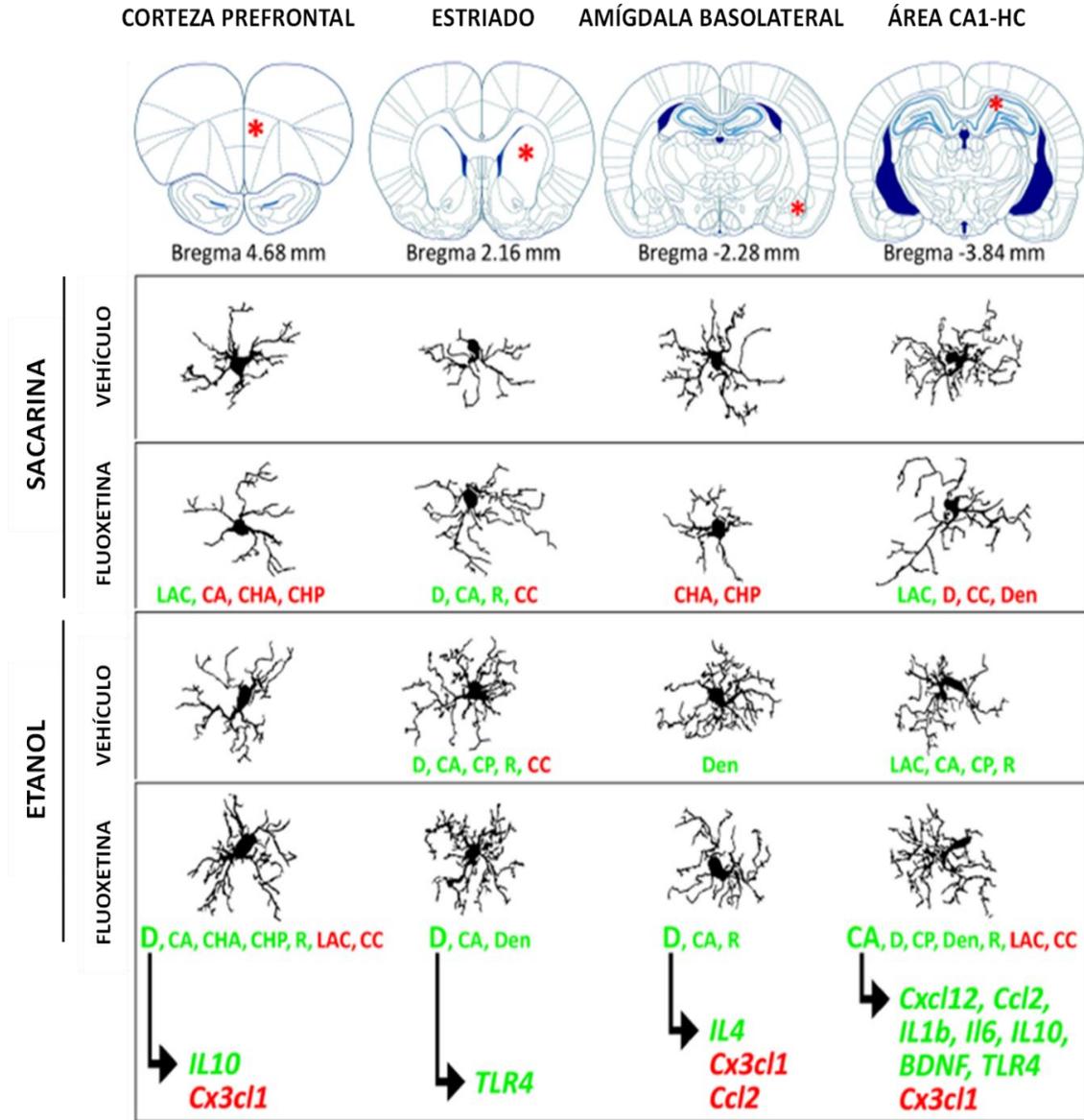


Ilustración 20 Representación esquemática que resume los principales efectos del cese del tratamiento con fluoxetina y el restablecimiento del consumo de etanol sobre la morfología microglial y su asociación con el fenotipo reactivo (respuesta inflamatoria) en cada región del cerebro analizada. El color verde representa la existencia de correlación positiva, mientras que el rojo representa una correlación negativa.

DISCUSIÓN

LIMITACIONES

Hay que destacar que en el presente estudio existieron algunas limitaciones. Por ejemplo, al tratarse de una muestra caracterizada por ratas macho, los datos obtenidos de nuestro estudio deberían extenderse a ratas hembra, con la finalidad de evaluar el dimorfismo sexual de los efectos del incremento en el consumo de alcohol producido por el cese del tratamiento antidepresivo fluoxetina. De acuerdo a este aspecto, también sería procedente valorar las modificaciones producidas en la reactividad de las células microgliales en ratas hembra.

A su vez, una limitación del estudio fue no analizar la compulsividad con la que los animales aprietan la palanca en el proceso de auto-administración de alcohol, para así determinar el rango de tiempo que tarda cada animal de cada grupo experimental en iniciar el autoconsumo de alcohol durante la fase de recaída del experimento, en qué sesión inician dicha reinstauración y, dentro de cada sesión el tiempo de latencia previo al autoconsumo de alcohol.

Dentro de las limitaciones, cabe destacar que al ejercer la fluoxetina un efecto antiinflamatorio, y variar este fenómeno en función de la variable consumo de alcohol, sería necesario verificar de forma más exhaustiva los efectos de este tratamiento antidepresivo mediante experimentos de diferentes dosis de autoconsumo de alcohol en diferente graduación y dosis, y así poder identificar los posibles efectos que el tratamiento puede ejercer a nivel comportamental y morfoestructural en función de la cantidad ingerida de alcohol. A su vez, sería de especial interés llevar a cabo un estudio comparativo de los diferentes tratamientos empleados, como el acamprosato, el topiramato, el pexacerfont o la buprenorfina, entre otros, para la deshabituación alcohólica en un modelo de auto-administración crónica de etanol, y observar los cambios ejercidos en la morfología y el fenotipo del sistema neuroinmune del cerebro.

DISCUSIÓN

Finalmente, debido a la evidencia contrastada en los últimos años que cuestiona la falta de efecto de la señalización de TLR4 en el consumo de alcohol (230), es necesario plantear un mayor cuerpo científico que evalúe mecanismos diferentes involucrados en las respuestas neuroinmunes y neuroinflamatorias, como por ejemplo el planteado por Ma & Cols. (231) sobre la participación de TLR4 en la regulación de la sedación inducida por alcohol a través del sistema histaminérgico.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El alcohol incrementó la inmunoreactividad del marcador microglial IBA-1 en regiones del sistema corticolímbico en un modelo preclínico de auto-consumo prolongado de alcohol, fase de abstinencia y recaída.
2. El cese abrupto del tratamiento antidepresivo fluoxetina, administrada durante la fase de abstinencia, produjo un aumento en el auto-consumo de alcohol durante la recaída.
3. El cese del tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia alcohólica no produjo ningún efecto en la inmunoreactividad microglial IBA-1 en las regiones analizadas del sistema corticolímbico en un modelo preclínico de auto-consumo prolongado de alcohol, fase de abstinencia y recaída.
4. El cese del tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia alcohólica produjo un incremento en la inmunoreactividad del marcador astrocítico GFAP en el área CA1 del HC y un aumento en el número de astrocitos marcados con GFAP en el estriado y la BLA.
5. El consumo de alcohol produjo cambios muy significativos en los parámetros morfométricos (D, rugosidad, CHA, CHP, CHC, RCHR y MR) de la microglía, principalmente en el estriado y la región CA1 del HC, sugiriendo un estado reactivo y ramificado de la microglia, con cierta polaridad celular, procesos celulares reducidos y gruesos, soma compacto, rugoso y de menor tamaño.
6. El cese del tratamiento con fluoxetina durante la abstinencia estuvo asociado a cambios sutiles en los principales parámetros morfométricos de la microglía, reflejados en una mayor complejidad espacial (D) y una menor heterogeneidad entre células (Λ), además de un mayor engrosamiento y una retracción de los procesos celulares (densidad y rugosidad), principalmente en las regiones del Str y CA1 del

CONCLUSIONES

- HC, lo que sugiere un morfotipo hiperramificado y un estado hiperactivo de la microglía.
7. El cese del tratamiento fluoxetina en animales con auto-consumo de alcohol redujo los niveles de fractalquina (Cx3cl1), una quimioquina de respuesta antiinflamatoria, en las regiones PFC, BLA e HC (región CA1). Además, la sobreexpresión del receptor TLR4 (Str y HC), activador a través del alcohol de mediadores inflamatorios, y el incremento de los factores inflamatorios IL1 β (PFC e HC), IL-4 (BLA y HC), Cxcl12, Ccl2, IL-6 y BDNF sugiere un perfil fenotípico proinflamatorio de la microglía que fue específico en cada región.
 8. El hipocampo dorsal fue la región cuya microglía manifestó la relación más evidente entre el aumento de la complejidad espacial (D) de la microglía y los cambios de expresión de numerosos factores inflamatorios, inducido por el cese del tratamiento fluoxetina en animales con auto-consumo de alcohol. Además, el Str resultó ser una región de especial relevancia en la correlación entre un aumento de TLR4 y ciertas modificaciones morfológicas (rugosidad y CC) de la microglía.
 9. Los resultados de este estudio preclínico sobre los efectos del cese abrupto del tratamiento del antidepresivo fluoxetina durante la abstinencia en un modelo de auto-consumo de alcohol abre la posibilidad de evaluar nuevas terapias anti-inflamatorias dentro del plan terapéutico del Trastorno por Uso de Alcohol que permita reducir los efectos degenerativos inflamatorios en pacientes TUA con comorbilidad depresiva.
 10. Es necesario un mayor volumen de evidencia científica que contemple como objeto el estudio clínico de pacientes con TUA y síntomas depresivos (primarios o secundarios) para poder abordar de forma más exhaustiva la eficacia del tratamiento con antidepresivos y, particularmente, los ISRS.

VII. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Pastor Esteban A. El alcohol en el siglo XXI. [Investigación y marketing](#); ISSN 1131-6144, [N.º 96, 2007](#).
2. Wachter Rodarte C. La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados. Revista Digital Universitaria (RDU); ISSN 1607-6079, 1 de agosto de 2014, vol. 15 (8). Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.15/num8/art64/>
3. Steinkraus KH. “Fermented foods of the world” en Wachter C. & Lappe P. “Alimentos fermentados indígenas de México (1993).
4. Peter Melville L. Nerves and Narratives: A Cultural History of Hysteria in 19th-Century British Prose. Berkeley: University of California Press, c1997 1997. <http://ark.cdlib.org/ark:/13030/ft5d5nb38x/>
5. Katcher BS. Benjamin Rush's educational campaign against hard drinking. *Am J Public Health*. 1993;83(2):273-281. doi:10.2105/ajph.83.2.273
6. Campos Marín R, García-Alejo RH. El alcoholismo como enfermedad social en la España de la Restauración: problemas de definición [Alcoholism as a social disease in Spain during the Restoration: problems of definition]. *Dynamis*. 1991;11:263-86. Spanish. PMID: 11612752.
7. Campos Marin R. Alcoholismo y reformismo social en la España de la restauracion [Alcoholism and reformism in restoration Spain]. *Cuad Complut Hist Med Cienc*. 1993;1:159-73. Spanish. PMID: 11624938.
8. Campos Marin R. Entre el vicio y la enfermedad. La construcción medicosocial del alcoholismo como patología en España (Siglos XIX y XX) [Between bad habit and disease. The medical-social construction of alcoholism as a disease in Spain (XIX and XX centuries). *Trastornos Adictivos*. 1999;1:3: págs. 280-286. Spanish. <https://www.elsevier.es/es-revista-trastornos-adictivos-182-articulo-entre-el-vicio-enfermedad-1a-13010700>
9. Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Health Statistics 2020. Non-Medical Determinants in Health: Alcohol consumption. <http://www.oecd.org/els/health-systems/health-data.htm>. Accessed to datasets in the 2021 online database at January, 25, 2020.
10. Organización Mundial de la Salud (OMS). Alcohol. Datos y Cifras [Internet]. OMS. 2018 [citado 25 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>
11. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social - Portal Plan Nacional sobre Drogas -. Portal Plan Nacional sobre Drogas [Internet]. [citado 25 de enero de 2021]. Disponible en: <http://www.pnsd.mscbs.gob.es/>
12. Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006;29(4):245-54. PMID: 17718403; PMCID: PMC6527027.
13. Alcoholes – Aldehídos y cetales – Materiales alcalinos. Organización Internacional del Trabajo (OIT). Enciclopedia de Salud y seguridad en el trabajo. Vol.4:2; (págs. 104.33-104.72). Disponible en: <https://www.insst.es/documents/94886/162038/2.+Alcoholes+-+Aldeh%C3%ADdos+y+cetales+-+Materiales+alcalinos>

BIBLIOGRAFÍA

14. Wang K, Liu Y, Ouedraogo Y, Wang N, Xie X, Xu C, Luo X. Principal component analysis of early alcohol, drug and tobacco use with major depressive disorder in US adults. *J Psychiatr Res.* 2018 May;100:113-120. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.02.022. Epub 2018 Feb 24. PMID: 29518578; PMCID: PMC6329582.
15. Lee JY, Brook JS, Finch SJ, Kim W, Brook DW. Single and dual diagnoses of major depressive disorder and posttraumatic stress disorder predicted by triple comorbid trajectories of tobacco, alcohol, and marijuana use among urban adults. *Subst Abus.* 2019;40(2):221-228. doi: 10.1080/08897077.2019.1572047. Epub 2019 Mar 19. PMID: 30888260; PMCID: PMC6938707.
16. Newton-Howes G, Boden JM. Relation between age of first drinking and mental health and alcohol and drug disorders in adulthood: evidence from a 35-year cohort study. *Addiction.* 2016 Apr;111(4):637-44. doi: 10.1111/add.13230. Epub 2016 Jan 8. Erratum in: *Addiction.* 2019 Nov;114(11):2089. PMID: 26566814.
17. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet.* 2009 Jun 27;373(9682):2223-33. doi: 10.1016/S0140-6736(09)60746-7. PMID: 19560604.
18. Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Jan;35(1):217-38. doi: 10.1038/npp.2009.110. Erratum in: *Neuropsychopharmacology.* 2010 Mar;35(4):1051. PMID: 19710631; PMCID: PMC2805560.
19. Heilig M, Egli M. Pharmacological treatment of alcohol dependence: target symptoms and target mechanisms. *Pharmacol Ther.* 2006 Sep;111(3):855-76. doi: 10.1016/j.pharmthera.2006.02.001. Epub 2006 Mar 20. PMID: 16545872.
20. Heilig M, Goldman D, Berrettini W, O'Brien CP. Pharmacogenetic approaches to the treatment of alcohol addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(11):670-684. Published 2011 Oct 20. doi:10.1038/nrn3110
21. Núñez C, Ochoa S, Huerta-Ramos E, Baños I, Barajas A, Dolz M, Sánchez B, Del Cacho N; GENIPE Group, Usall J. Differential effects of sex on substance use between first episode psychosis patients and healthy people. *Compr Psychiatry.* 2016 Aug;69:169-78. doi: 10.1016/j.comppsy.2016.05.017. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27423358.
22. Ballesta A, Alen F, Orio L, Arco R, Vadas E, Decara J, Vargas A, Gómez de Heras R, Ramírez-López M, Serrano A, Pavón FJ, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F. Abrupt cessation of reboxetine along alcohol deprivation results in alcohol intake escalation after reinstatement of drinking. *Addict Biol.* 2021 May;26(3):e12957. doi: 10.1111/adb.12957. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32815666.
23. Leshner AI. Addiction is a brain disease, and it matters. *Science.* 1997 Oct 3;278(5335):45-7. doi: 10.1126/science.278.5335.45. PMID: 9311924.
24. Shippenberg TS, Elmer GI. The neurobiology of opiate reinforcement. *Crit Rev Neurobiol.* 1998;12(4):267-303. doi: 10.1615/critrevneurobiol.v12.i4.10. PMID: 10348612.
25. Castilla-Ortega E, Serrano A, Blanco E, Araos P, Suárez J, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ. A place for the hippocampus in the cocaine addiction circuit: Potential roles for adult

BIBLIOGRAFÍA

- hippocampal neurogenesis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2016 Jul;66:15-32. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.03.030. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27118134.
26. Ladrón de Guevara-Miranda D, Pavón FJ, Serrano A, Rivera P, Estivill-Torrús G, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Santín LJ, Castilla-Ortega E. Cocaine-conditioned place preference is predicted by previous anxiety-like behavior and is related to an increased number of neurons in the basolateral amygdala. *Behav Brain Res.* 2016 Feb 1;298(Pt B):35-43. doi: 10.1016/j.bbr.2015.10.048. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26523857.
27. Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci.* 2005 Nov;8(11):1481-9. doi: 10.1038/nm1579. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2006 Jul;9(7):979. PMID: 16251991.
28. Roberts AJ, Koob GF. The neurobiology of addiction: an overview. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(2):101-6. PMID: 15704343; PMCID: PMC6826825.
29. López-Gamero AJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Energy sensors in drug addiction: A potential therapeutic target. *Addict Biol.* 2021 Mar;26(2):e12936. doi: 10.1111/adb.12936. Epub 2020 Jul 7. PMID: 32638485.
30. Minozzi S, Saulle R, Rösner S. Baclofen for alcohol use disorder. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 Nov 26;11(11):CD012557. doi: 10.1002/14651858.CD012557.pub2. PMID: 30484285; PMCID: PMC6517285.
31. Beraha EM, Salemink E, Krediet E, Wiers RW. Can baclofen change alcohol-related cognitive biases and what is the role of anxiety herein? *J Psychopharmacol.* 2018 Aug;32(8):867-875. doi: 10.1177/0269881118780010. Epub 2018 Jun 13. PMID: 29897022; PMCID: PMC6125818.
32. Kasten CR, Blasingame SN, Boehm SL 2nd. Bidirectional enantioselective effects of the GABAB receptor agonist baclofen in two mouse models of excessive ethanol consumption. *Alcohol.* 2015 Feb;49(1):37-46. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.11.005. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25557834; PMCID: PMC4314367.
33. NIDA. Efectos de las drogas sobre la neurotransmisión. National Institute on Drug Abuse website. <https://archives.drugabuse.gov/es/news-events/nida-notes/2017/08/efectos-de-las-drogas-sobre-la-neurotransmision>. agosto 23, 2017. Accedido 23 de enero del 2022.
34. Cadete-Leite A, Brandao F, Andrade JP, Ribeiro-da-Silva A, Paula-Barbosa MM. The GABAergic system of the dentate gyrus after withdrawal from chronic alcohol consumption: effects of intracerebral grafting and putative neuroprotective agents. *Alcohol*, 32 (1997), pp. 471-84.
35. Charlton ME, Sweetnam PM, Fitzgerald LW, Terwilliger RZ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic ethanol administration regulates the expression of GABAA receptor alpha 1 and alpha 5 subunits in the ventral tegmental area and hippocampus. *J Neurochem*, 68 (1997), pp. 121-7
36. Carroll ME, Lac ST, Asencio M, Kragh R. Fluoxetine reduces intravenous cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1990 Jan;35(1):237-44. doi: 10.1016/0091-3057(90)90232-7. PMID: 2315363.

BIBLIOGRAFÍA

37. Pietraszek MH, Urano T, Sumioshi K, Serizawa K, Takahashi S, Takada Y, Takada A. Alcohol-induced depression: involvement of serotonin. *Alcohol Alcohol*. 1991;26(2):155-9. doi: 10.1093/oxfordjournals.alcalc.a045096. PMID: 1878077.
38. Davidson KM. Diagnosis of depression in alcohol dependence: changes in prevalence with drinking status. *Br J Psychiatry*. 1995 Feb;166(2):199-204. doi: 10.1192/bjp.166.2.199. PMID: 7728364.
39. De Luca MA, Buczynski MW, Di Chiara G (2018) Loren Parsons' contribution to addiction neurobiology. *Addict Biol* 23:1207–1222
40. Gawliński D, Smaga I, Zaniewska M, Mudlaff K, Faron-Górecka A, Filip M (2019) Adaptive mechanisms following antidepressant drugs: focus on serotonin 5-HT_{2A} receptors. *Pharmacol Rep*.
41. Prajapati SK, Bhaseen S, Krishnamurthy S, Sahu AN. Neurochemical Evidence of Preclinical and Clinical Reports on Target-Based Therapy in Alcohol Use Disorder. *Neurochem Res*. 2020 Feb;45(2):491-507. doi: 10.1007/s11064-019-02944-9. Epub 2020 Jan 2. PMID: 31898084.
42. Fox HC, Anderson GM, Tuit K, Hansen J, Kimmerling A, Siedlarz KM, Morgan PT, Sinha R. Prazosin effects on stress- and cue-induced craving and stress response in alcohol-dependent individuals: preliminary findings. *Alcohol Clin Exp Res*. 2012 Feb;36(2):351-60. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01628.x. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21919922; PMCID: PMC3243763.
43. Jonas DE, Amick HR, Feltner C, Bobashev G, Thomas K, Wines R, Kim MM, Shanahan E, Gass CE, Rowe CJ, Garbutt JC. Pharmacotherapy for adults with alcohol use disorders in outpatient settings: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2014 May 14;311(18):1889-900. doi: 10.1001/jama.2014.3628. PMID: 24825644.
44. Mason BJ, Quello S, Shadan F. Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018 Jan;27(1):113-124. doi: 10.1080/13543784.2018.1417383. Epub 2017 Dec 23. PMID: 29241365; PMCID: PMC5957503.
45. Mason BJ, Heyser CJ. Alcohol Use Disorder: The Role of Medication in Recovery. *Alcohol Res*. 2021 Jun 3;41(1):07. doi: 10.35946/arcr.v41.1.07. PMID: 34113531; PMCID: PMC8184096.
46. Mann K, Kiefer F, Spanagel R, Littleton J. Acamprosate: recent findings and future research directions. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008 Jul;32(7):1105-10. doi: 10.1111/j.1530-0277.2008.00690.x. PMID: 18540918.
47. Palpacuer C, Duprez R, Huneau A, Locher C, Boussageon R, Laviolle B, Naudet F. Pharmacologically controlled drinking in the treatment of alcohol dependence or alcohol use disorders: a systematic review with direct and network meta-analyses on nalmefene, naltrexone, acamprosate, baclofen and topiramate. *Addiction*. 2018 Feb;113(2):220-237. doi: 10.1111/add.13974. Epub 2017 Sep 20. PMID: 28940866.
48. Manhapra A, Chakraborty A, Arias AJ. Topiramate Pharmacotherapy for Alcohol Use Disorder and Other Addictions: A Narrative Review. *J Addict Med*. 2019 Jan/Feb;13(1):7-22. doi: 10.1097/ADM.0000000000000443. PMID: 30096077.

BIBLIOGRAFÍA

49. Funk CK, Koob GF. A CRF(2) agonist administered into the central nucleus of the amygdala decreases ethanol self-administration in ethanol-dependent rats. *Brain Res.* 2007 Jun 25;1155:172-8. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.009. Epub 2007 Apr 10. PMID: 17512918; PMCID: PMC2741495.
50. Cohen A, Treweek J, Edwards S, Leão RM, Schulteis G, Koob GF, George O. Extended access to nicotine leads to a CRF1 receptor dependent increase in anxiety-like behavior and hyperalgesia in rats. *Addict Biol.* 2015 Jan;20(1):56-68. doi: 10.1111/adb.12077. Epub 2013 Jul 22. PMID: 23869743; PMCID: PMC3859819.
51. Kwako LE, Spagnolo PA, Schwandt ML, Thorsell A, George DT, Momenan R, Rio DE, Huestis M, Anizan S, Concheiro M, Sinha R, Heilig M. The corticotropin releasing hormone-1 (CRH1) receptor antagonist pexacerfont in alcohol dependence: a randomized controlled experimental medicine study. *Neuropsychopharmacology.* 2015 Mar 13;40(5):1053-63. doi: 10.1038/npp.2014.306. PMID: 25409596; PMCID: PMC4367465.
52. Schwandt ML, Cortes CR, Kwako LE, George DT, Momenan R, Sinha R, Grigoriadis DE, Pich EM, Leggio L, Heilig M. The CRF1 Antagonist Verucerfont in Anxious Alcohol-Dependent Women: Translation of Neuroendocrine, But not of Anti-Craving Effects. *Neuropsychopharmacology.* 2016 Nov;41(12):2818-2829. doi: 10.1038/npp.2016.61. Epub 2016 Apr 25. PMID: 27109623; PMCID: PMC5061889.
53. Ciccocioppo R, Economidou D, Rimondini R, Sommer W, Massi M, Heilig M. Buprenorphine reduces alcohol drinking through activation of the nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor system. *Biol Psychiatry.* 2007 Jan 1;61(1):4-12. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.01.006. Epub 2006 Mar 14. PMID: 16533497; PMCID: PMC3035814.
54. Haeny AM, Gueorguieva R, Montgomery L, Bold KW, Fucito LM, Wu R, Muvvala SB, Zweben A, O'Malley SS. The effect of varenicline on smoking and drinking outcomes among Black and White adults with alcohol use disorder and co-occurring cigarette smoking: A secondary analysis of two clinical trials. *Addict Behav.* 2021 Nov;122:106970. doi: 10.1016/j.addbeh.2021.106970. Epub 2021 May 1. PMID: 34216871.
55. Oliva JM, Urigüen L, Pérez-Rial S, Manzanares J. Time course of opioid and cannabinoid gene transcription alterations induced by repeated administration with fluoxetine in the rat brain. *Neuropharmacology.* 2005 Oct;49(5):618-26. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.04.014. PMID: 15936043.
56. Sociedad Española de Investigación sobre Cannabinoides (SEIC). ACTUALIZACIÓN SOBRE EL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LOS CANNABINOIDES. Universidad Complutense de Madrid (Madrid). 2009 (cap. 13-15):219-239;257-271. ISBN:978-84-692-0828-1.
57. Garcia-Marchena N, Pavon FJ, Pastor A, Araos P, Pedraz M, Romero-Sanchiz P, Calado M, Suarez J, Castilla-Ortega E, Orio L, Boronat A, Torrens M, Rubio G, de la Torre R, Rodriguez de Fonseca F, Serrano A. Plasma concentrations of oleoylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence. *Addict Biol.* 2017 Sep;22(5):1366-1377. doi: 10.1111/adb.12408. Epub 2016 May 22. PMID: 27212249.

BIBLIOGRAFÍA

58. Palazuelos J, Ortega Z, Díaz-Alonso J, Guzmán M, Galve-Roperh I. CB2 cannabinoid receptors promote neural progenitor cell proliferation via mTORC1 signaling. *J Biol Chem.* 2012 Jan 6;287(2):1198-209. doi: 10.1074/jbc.M111.291294. Epub 2011 Nov 18. PMID: 22102284; PMCID: PMC3256884.
59. Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia.* 2010 Jul;58(9):1017-30. doi: 10.1002/glia.20983. PMID: 20468046; PMCID: PMC2919281.
60. Rivera P, Blanco E, Bindila L, Alen F, Vargas A, Rubio L, Pavón FJ, Serrano A, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J (2015). Pharmacological activation of CB2 receptors counteracts the deleterious effect of ethanol on cell proliferation in the main neurogenic zones of the adult rat brain. *Front. Cell. Neurosci.* 9:379. doi: 10.3389/fncel.2015.00379.
61. Ferguson LB, Most D, Blednov YA, Harris RA (2014). PPAR agonists regulate brain gene expression: Relationship to their effects on ethanol consumption. *Neuropharmacology* 86:397-407. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.06.024.
62. Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orio L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F (2016). Role of the satiety factor oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict. Biol.* 21:859-72. doi:10.1111/adb.12276.
63. Parsons LH, Hurd YL. Endocannabinoid signalling in reward and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2015 Oct;16(10):579-94. doi: 10.1038/nrn4004. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26373473; PMCID: PMC4652927.
64. Gilpin NW, Misra K, Herman MA, Cruz MT, Koob GF, Roberto M. Neuropeptide Y opposes alcohol effects on gamma-aminobutyric acid release in amygdala and blocks the transition to alcohol dependence. *Biol Psychiatry.* 2011 Jun 1;69(11):1091-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2011.02.004. Epub 2011 Apr 3. PMID: 21459365; PMCID: PMC3090491.
65. Heilig M, Koob GF. A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci.* 2007 Aug;30(8):399-406. doi: 10.1016/j.tins.2007.06.006. Epub 2007 Jul 16. PMID: 17629579; PMCID:
66. Martin-Fardon R, Zorrilla EP, Ciccocioppo R, Weiss F. Role of innate and drug-induced dysregulation of brain stress and arousal systems in addiction: Focus on corticotropin-releasing factor, nociceptin/orphanin FQ, and orexin/hypocretin. *Brain Res.* 2010 Feb 16;1314:145-61. doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.027. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20026088; PMCID: PMC2819635.
67. Mitchell JM, Arcuni PA, Weinstein D, Woolley JD. Intranasal Oxytocin Selectively Modulates Social Perception, Craving, and Approach Behavior in Subjects With Alcohol Use Disorder. *J Addict Med.* 2016 May-Jun;10(3):182-9. doi: 10.1097/ADM.0000000000000213. PMID: 27159342.
68. Mason BJ. Emerging pharmacotherapies for alcohol use disorder. *Neuropharmacology.* 2017 Aug 1;122:244-253. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.032. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28454983; PMCID: PMC5643030.

BIBLIOGRAFÍA

69. Fergusson DM, Boden JM, Horwood LJ. Tests of causal links between alcohol abuse or dependence and major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2009 Mar;66(3):260-6. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2008.543. PMID: 19255375.
70. Hauser SR, Getachew B, Taylor RE, Tizabi Y. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. *Pharmacol Biochem Behav*. 2011 Dec;100(2):253-8. doi: 10.1016/j.pbb.2011.08.014. Epub 2011 Sep 10. PMID: 21930150; PMCID: PMC3199315.
71. Khantzian EJ. The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harv Rev Psychiatry*. 1997 Jan-Feb;4(5):231-44. doi: 10.3109/10673229709030550. PMID: 9385000.
72. Naranjo CA, Knoke DM. The role of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing alcohol consumption. *J Clin Psychiatry*. 2001;62 Suppl 20:18-25. PMID: 11584871.
73. Mark TL, Meinhofer A, Zarkin GA. Receipt of Substance Use Disorder Treatment Among Patients Visiting Psychiatrists. *J Addict Med*. 2019 May/June;13(3):248-249. doi: 10.1097/ADM.0000000000000478. PMID: 30461443.
74. Coupland C, Hill T, Morriss R, Arthur A, Moore M, Hippisley-Cox J. Antidepressant use and risk of suicide and attempted suicide or self harm in people aged 20 to 64: cohort study using a primary care database. *BMJ*. 2015 Feb 18;350:h517. doi: 10.1136/bmj.h517. PMID: 25693810; PMCID: PMC4353276.
75. Boletín electrónico Mayo clinic. Antidepresivos tricíclicos y antidepresivos tetracíclicos. 2019 Jun. (Acceso el 21 de Junio de 2021). Disponible en: <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/depression/in-depth/antidepressants/art-20046983>
76. Uzbay IT. Serotonergic anti-depressants and ethanol withdrawal syndrome: a review. *Alcohol Alcohol*. 2008 Jan-Feb;43(1):15-24. doi: 10.1093/alcalc/agm145. Epub 2007 Oct 12. PMID: 17934195.
77. Simon O'Brien E, Legastelois R, Houchi H, Vilpoux C, Alaux-Cantin S, Pierrefiche O, André E, Naassila M. Fluoxetine, desipramine, and the dual antidepressant milnacipran reduce alcohol self-administration and/or relapse in dependent rats. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Jun;36(7):1518-30. doi: 10.1038/npp.2011.37. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21430652; PMCID: PMC3096819.
78. Bell RL, Hauser SR, Liang T, Sari Y, Maldonado-Devincini A, Rodd ZA. Rat animal models for screening medications to treat alcohol use disorders. *Neuropharmacology*. 2017 Aug 1;122:201-243. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.02.004. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28215999; PMCID: PMC5659204.
79. Agabio R, Trogu E, Pani PP. Antidepressants for the treatment of people with co-occurring depression and alcohol dependence. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018 Apr 24;4(4):CD008581. doi: 10.1002/14651858.CD008581.pub2. PMID: 29688573; PMCID: PMC6494437.
80. Milior G, Lecours C, Samson L, Bisht K, Poggini S, Pagani F, Deflorio C, Lauro C, Alboni S, Limatola C, Branchi I, Tremblay ME, Maggi L. Fractalkine receptor deficiency impairs microglial

BIBLIOGRAFÍA

- and neuronal responsiveness to chronic stress. *Brain Behav Immun*. 2016 Jul;55:114-125. doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.024. Epub 2015 Jul 29. PMID: 26231972.
81. Branchi I, Santarelli S, Capoccia S, Poggini S, D'Andrea I, Cirulli F, Alleva E. Antidepressant treatment outcome depends on the quality of the living environment: a pre-clinical investigation in mice. *PLoS One*. 2013 Apr 30;8(4):e62226. doi: 10.1371/journal.pone.0062226. PMID: 23653679; PMCID: PMC3639948.
82. Branchi I, Poggini S, Capuron L, Benedetti F, Poletti S, Tamouza R, Drexhage HA, Penninx BWJH, Pariante CM; European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) ImmunoNeuroPsychiatry Thematic Working Group and Marion Leboyer. Brain-immune crosstalk in the treatment of major depressive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2021 Apr;45:89-107. doi: 10.1016/j.euroneuro.2020.11.016. Epub 2020 Dec 29. PMID: 33386229.
83. Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M. Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend*. 2005 Apr 4;78(1):1-22. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004. Epub 2004 Nov 11. PMID: 15769553.
84. Alén F, Orió L, Gorriti MÁ, de Heras RG, Ramírez-López MT, Pozo MÁ, de Fonseca FR. Increased alcohol consumption in rats after subchronic antidepressant treatment. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013 Sep;16(8):1809-18. doi: 10.1017/S1461145713000217. Epub 2013 Apr 3. PMID: 23551979.
85. Furukawa TA, Cipriani A, Barbui C, Geddes JR. Long-term treatment of depression with antidepressants: a systematic narrative review. *Can J Psychiatry*. 2007 Sep;52(9):545-52. doi: 10.1177/070674370705200902. PMID: 17953158.
86. Boulanger LM. Immune proteins in brain development and synaptic plasticity. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):93-109. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.001. PMID: 19840552.
87. Deverman BE, Patterson PH. Cytokines and CNS development. *Neuron*. 2009 Oct 15;64(1):61-78. doi: 10.1016/j.neuron.2009.09.002. PMID: 19840550.
88. Frank MG, Watkins LR, Maier SF. Stress- and glucocorticoid-induced priming of neuroinflammatory responses: potential mechanisms of stress-induced vulnerability to drugs of abuse. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1(Suppl 1):S21-8. doi: 10.1016/j.bbi.2011.01.005. Epub 2011 Jan 21. PMID: 21256955; PMCID: PMC3238082.
89. Haroon E, Raison CL, Miller AH. Psychoneuroimmunology meets neuropsychopharmacology: translational implications of the impact of inflammation on behavior. *Neuropsychopharmacology*. 2012 Jan;37(1):137-62. doi: 10.1038/npp.2011.205. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21918508; PMCID: PMC3238082.
90. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):610-21. doi: 10.1056/NEJMra052723. PMID: 16467548.
91. Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 Feb;2(2):95-101. doi: 10.1038/84298. PMID: 11175800.

BIBLIOGRAFÍA

92. Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:469-99. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838. PMID: 11807180.
93. Takeshita Y, Ransohoff RM. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. *Immunol Rev.* 2012 Jul;248(1):228-39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x. PMID: 22725965; PMCID: PMC3383666.
94. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):902-9. doi: 10.1172/JCI29919. Epub 2007 Mar 15. PMID: 17364026; PMCID: PMC1810572..
95. Palomino DC, Marti LC. Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo).* 2015 Jul-Sep;13(3):469-73. doi: 10.1590/S1679-45082015RB3438. PMID: 26466066; PMCID: PMC4943798..
96. Heinisch S, Kirby LG. SDF-1alpha/CXCL12 enhances GABA and glutamate synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology.* 2010 Feb;58(2):501-14. doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.08.022. Epub 2009 Sep 13. PMID: 19755127; PMCID: PMC2813394.
97. Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci.* 2007 Nov;8(11):895-903. doi: 10.1038/nrn2255. PMID: 17948033..
98. Cali C, Marchaland J, Regazzi R, Bezzi P. SDF 1-alpha (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol.* 2008 Jul 31;198(1-2):82-91. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.04.015. Epub 2008 Jun 6. PMID: 18538866.
99. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron.* 2013 Jan 9;77(1):10-8. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.023. PMID: 23312512.
100. Tremblay MÈ, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A. The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci.* 2011 Nov 9;31(45):16064-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011. PMID: 22072657; PMCID: PMC6633221.
101. Rivest S. Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):429-39. doi: 10.1038/nri2565. PMID: 19461673.
102. Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology.* 2006 Jul;31(7):1574-82. doi: 10.1038/sj.npp.1300947. Epub 2005 Nov 2. PMID: 16292326.
103. Marcos M, Pastor I, González-Sarmiento R, Laso FJ. Interleukin-10 gene polymorphism is associated with alcoholism but not with alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.* 2008 Sep-Oct;43(5):523-8. doi: 10.1093/alcal/agn026. Epub 2008 Apr 24. PMID: 18436572.
104. Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation.* 2008 Mar 18;5:10. doi: 10.1186/1742-2094-5-10. PMID: 18348728; PMCID: PMC2373291.

BIBLIOGRAFÍA

105. Liu J, Yang AR, Kelly T, Puche A, Esoga C, June HL Jr, Elnabawi A, Merchenthaler I, Sieghart W, June HL Sr, Aurelian L. Binge alcohol drinking is associated with GABAA alpha2-regulated Toll-like receptor 4 (TLR4) expression in the central amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108(11):4465-70. doi: 10.1073/pnas.1019020108. Epub 2011 Feb 28. PMID: 21368176; PMCID: PMC3060224.
106. Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci*. 2010 Jun 16;30(24):8285-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010. PMID: 20554880; PMCID: PMC6634595.
107. Crews FT, Qin L, Sheedy D, Vetreno RP, Zou J. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 2013 Apr 1;73(7):602-12. doi: 10.1016/j.biopsych.2012.09.030. Epub 2012 Dec 1. PMID: 23206318; PMCID: PMC3602398.
108. Leclercq S, Cani PD, Neyrinck AM, Stärkel P, Jamar F, Mikolajczak M, Delzenne NM, de Timary P. Role of intestinal permeability and inflammation in the biological and behavioral control of alcohol-dependent subjects. *Brain Behav Immun*. 2012 Aug;26(6):911-8. doi: 10.1016/j.bbi.2012.04.001. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22521198.
109. Leclercq S, De Saeger C, Delzenne N, de Timary P, Stärkel P. Role of inflammatory pathways, blood mononuclear cells, and gut-derived bacterial products in alcohol dependence. *Biol Psychiatry*. 2014 Nov 1;76(9):725-33. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.02.003. Epub 2014 Feb 14. PMID: 24629538.
110. Robinson G, Most D, Ferguson LB, Mayfield J, Harris RA, Blednov YA. Neuroimmune pathways in alcohol consumption: evidence from behavioral and genetic studies in rodents and humans. *Int Rev Neurobiol*. 2014;118:13-39. doi: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00002-6. PMID: 25175860; PMCID: PMC4264574.
111. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia*. 2007 Apr 1;55(5):453-62. doi: 10.1002/glia.20467. PMID: 17203472; PMCID: PMC2871685.
112. Blednov YA, Benavidez JM, Geil C, Perra S, Morikawa H, Harris RA. Activation of inflammatory signaling by lipopolysaccharide produces a prolonged increase of voluntary alcohol intake in mice. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1(Suppl 1):S92-S105. doi: 10.1016/j.bbi.2011.01.008. Epub 2011 Jan 23. PMID: 21266194; PMCID: PMC3098320.
113. Bajo M, Madamba SG, Roberto M, Blednov YA, Sagi VN, Roberts E, Rice KC, Harris RA, Siggins GR. Innate immune factors modulate ethanol interaction with GABAergic transmission in mouse central amygdala. *Brain Behav Immun*. 2014 Aug;40:191-202. doi: 10.1016/j.bbi.2014.03.007. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24675033; PMCID: PMC4126651.
114. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ*. 2006 May;13(5):816-25. doi: 10.1038/sj.cdd.4401850. PMID: 16410796.

BIBLIOGRAFÍA

115. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 2010 Feb;58(3):253-63. doi: 10.1002/glia.20928. PMID: 19705460.
116. Li XQ, Wang J, Fang B, Tan WF, Ma H. Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats. *Mol Brain*. 2014 Apr 21;7:28. doi: 10.1186/1756-6606-7-28. PMID: 24751148; PMCID: PMC4022154.
117. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):3916-24. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3916. PMID: 15356140.
118. 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 Jan-Feb;48(1):19-47. doi: 10.3109/10408363.2011.580567. PMID: 21657944.
119. Alliot F, Godin I, Pessac B. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999 Nov 18;117(2):145-52. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00113-3. PMID: 10567732.
120. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007 Feb;53(2):344-54. doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.11.002. Epub 2006 Dec 26. PMID: 17188751.
121. Achúcarro, N. (1911). Nuevo método para el estudio de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Boletín Soc. Española Biol*. I, 139–141.
122. Río-Hortega, P. (1919a). El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. *Boletín Soc. Española Biol*. 8, 67–82.
123. Río-Hortega, P. (1919b). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos granuloaliposos). *Boletín Soc. Española Biol*. VIII, 91–103.
124. Río-Hortega, P. (1919c). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. III. Naturaleza probable de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol*. VIII, 108–115.
125. Río-Hortega, P. (1919d). El “tercer elemento de los centros nerviosos”. IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Boletín Soc. Española Biol*. VIII, 154–166.
126. Río-Hortega, P. (1922). ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Boletín Soc. Española Biol*. X, 1–4.
127. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005 Jun;8(6):752-8. doi: 10.1038/nn1472. Epub 2005 May 15. PMID: 15895084.
128. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*. 2005 May 27;308(5726):1314-8. doi: 10.1126/science.1110647. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831717.

BIBLIOGRAFÍA

129. Sierra A, Abiega O, Shahraz A, Neumann H. Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Front Cell Neurosci.* 2013 Jan 30;7:6. doi: 10.3389/fncel.2013.00006. PMID: 23386811; PMCID: PMC3558702.
130. Hermann DM, ElAli A. The abluminal endothelial membrane in neurovascular remodeling in health and disease. *Sci Signal.* 2012 Aug 7;5(236):re4. doi: 10.1126/scisignal.2002886. PMID: 22871611.
131. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009 Apr 1;29(13):3974-80. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009. PMID: 19339593; PMCID: PMC6665392.
132. Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1992;48(2):405-15. doi: 10.1016/0306-4522(92)90500-2. PMID: 1603325.
133. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119-45. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528. PMID: 19302036.
134. Wolf Y, Yona S, Kim KW, Jung S. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci.* 2013 Mar 18;7:26. doi: 10.3389/fncel.2013.00026. PMID: 23507975; PMCID: PMC3600435.
135. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev.* 2011 Apr;91(2):461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010. PMID: 21527731.
136. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol.* 2016 Feb;173(4):649-65. doi: 10.1111/bph.13139. Epub 2015 May 11. PMID: 25800044; PMCID: PMC4742299.
137. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014 Mar 3;6:13. doi: 10.12703/P6-13. PMID: 24669294; PMCID: PMC3944738.
138. Ransohoff RM, Brown MA. Innate immunity in the central nervous system. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1164-71. doi: 10.1172/JCI58644. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22466658; PMCID: PMC3314450..
139. Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):5004-10. doi: 10.4049/jimmunol.167.9.5004. PMID: 11673508.
140. Neumann J, Sauerzweig S, Röncke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, Gunzer M, Reymann KG. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci.* 2008 Jun 4;28(23):5965-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0060-08.2008. PMID: 18524901; PMCID: PMC6670327.
141. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol.* 2011 Feb;30(1):16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976. PMID: 21235323.
142. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol.* 1990 Apr 15;144(8):2999-3007. PMID: 2109008.

BIBLIOGRAFÍA

143. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 2007 Mar;28(3):138-45. doi: 10.1016/j.it.2007.01.005. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17276138.
144. Tian L, Ma L, Kaarela T, Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *J Neuroinflammation.* 2012 Jul 2;9:155. doi: 10.1186/1742-2094-9-155. PMID: 22747919; PMCID: PMC3410819..
145. Mildner A, Mack M, Schmidt H, Brück W, Djukic M, Zabel MD, Hille A, Priller J, Prinz M. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain.* 2009 Sep;132(Pt 9):2487-500. doi: 10.1093/brain/awp144. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19531531.
146. Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol.* 1998 May 15;160(10):4671-80. PMID: 9590212.
147. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 1990;39(1):151-70. doi: 10.1016/0306-4522(90)90229-w. PMID: 2089275.
148. Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. The microglial cytoskeleton: vimentin is localized within activated cells in situ. *J Neurocytol.* 1988 Aug;17(4):573-80. doi: 10.1007/BF01189811. PMID: 3193132.
149. Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull.* 1994;34(1):73-8. doi: 10.1016/0361-9230(94)90189-9. PMID: 8193937.
150. Ayoub AE, Salm AK. Increased morphological diversity of microglia in the activated hypothalamic supraoptic nucleus. *J Neurosci.* 2003 Aug 27;23(21):7759-66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-21-07759.2003. PMID: 12944504; PMCID: PMC6740605.
151. Hinwood M, Tynan RJ, Charnley JL, Beynon SB, Day TA, Walker FR. Chronic stress induced remodeling of the prefrontal cortex: structural re-organization of microglia and the inhibitory effect of minocycline. *Cereb Cortex.* 2013 Aug;23(8):1784-97. doi: 10.1093/cercor/bhs151. Epub 2012 Jun 17. PMID: 22710611.
152. SHOLL DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat.* 1953 Oct;87(4):387-406. PMID: 13117757; PMCID: PMC1244622.
153. Yamada J, Jinno S. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J Comp Neurol.* 2013 Apr 1;521(5):1184-201. doi: 10.1002/cne.23228. PMID: 22987820.
154. Torres-Platas SG, Comeau S, Rachalski A, Bo GD, Cruceanu C, Turecki G, Giros B, Mechawar N. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex. *J Neuroinflammation.* 2014 Jan 21;11:12. doi: 10.1186/1742-2094-11-12. PMID: 24447857; PMCID: PMC3906907.
155. Santos-Filho C, de Lima CM, Fôro CA, de Oliveira MA, Magalhães NG, Guerreiro-Diniz C, Diniz DG, Vasconcelos PF, Diniz CW. Visuospatial learning and memory in the *Cebus apella* and microglial morphology in the molecular layer of the dentate gyrus and CA1 lacunosum molecular

BIBLIOGRAFÍA

- layer. *J Chem Neuroanat.* 2014 Nov;61-62:176-88. doi: 10.1016/j.jchemneu.2014.10.001. Epub 2014 Oct 22. PMID: 25462387.
- 156.Ohgomori T, Yamada J, Takeuchi H, Kadomatsu K, Jinno S. Comparative morphometric analysis of microglia in the spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Neurosci.* 2016 May;43(10):1340-51. doi: 10.1111/ejn.13227. Epub 2016 Apr 4. PMID: 26946061.
- 157.Mandelbrot, B. B. (1982). *The Fractal Geometry of Nature*. New York: WH Freeman and Company.
- 158.Mandelbrot, B. (1987). *Los objetos fractales: Forma, azar y dimensión*. 2nd Editio. Barcelona: Tutquets editores.
- 159.Cutting JE, Garvin JJ. Fractal curves and complexity. *Percept Psychophys.* 1987 Oct;42(4):365-70. doi: 10.3758/bf03203093. PMID: 3684493.
- 160.Goldberger AL, West BJ. Fractals in physiology and medicine. *Yale J Biol Med.* 1987 Sep-Oct;60(5):421-35. PMID: 3424875; PMCID: PMC2590346.
- 161.Bernard F, Bossu JL, Gaillard S. Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J Neurosci Res.* 2001 Sep 1;65(5):439-45. doi: 10.1002/jnr.1172. PMID: 11536328.
- 162.Milosević NT, Ristanović D, Gudović R, Rajković K, Marić D. Application of fractal analysis to neuronal dendritic arborisation patterns of the monkey dentate nucleus. *Neurosci Lett.* 2007 Sep 20;425(1):23-7. doi: 10.1016/j.neulet.2007.08.009. Epub 2007 Aug 11. PMID: 17723278.
- 163.Plotnick RE, Gardner RH, Hargrove WW, Prestegard K, Perlmutter M. Lacunarity analysis: A general technique for the analysis of spatial patterns. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 1996 May;53(5):5461-5468. doi: 10.1103/physreve.53.5461. PMID: 9964879.
- 164.Karperien, A., Jelinek, H. F., and Milosevic, N. (2011). Reviewing lacunarity analysis and classification of microglia in neuroscience. in *ESMTB*
- 165.Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebreg P, López-Ávalos MD. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci.* 2017 Aug 8;11:235. doi: 10.3389/fncel.2017.00235. PMID: 28848398; PMCID: PMC5550745.
- 166.Rivera P, Fernández-Arjona MDM, Silva-Peña D, Blanco E, Vargas A, López-Ávalos MD, Grondona JM, Serrano A, Pavón FJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Pharmacological blockade of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597 improves memory and changes the phenotype of hippocampal microglia despite ethanol exposure. *Biochem Pharmacol.* 2018 Nov;157:244-257. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.005. Epub 2018 Aug 9. PMID: 30098312.
- 167.Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Fernández-Llebreg P, López-Ávalos MD. Microglial Morphometric Parameters Correlate With the Expression Level of IL-1 β , and Allow Identifying Different Activated Morphotypes. *Front Cell Neurosci.* 2019 Oct 25;13:472. doi: 10.3389/fncel.2019.00472. PMID: 31708746; PMCID: PMC6824358.
- 168.Fernández-Arjona MDM, Grondona JM, Fernández-Llebreg P, López-Ávalos MD. Microglial activation by microbial neuraminidase through TLR2 and TLR4 receptors. *J Neuroinflammation.*

BIBLIOGRAFÍA

- 2019 Dec 2;16(1):245. doi: 10.1186/s12974-019-1643-9. PMID: 31791382; PMCID: PMC6889729.
169. Aranda J, Fernández-Arjona MDM, Alén F, Rivera P, Rubio L, Smith-Fernández I, Pavón FJ, Serrano A, Serrano-Castro PJ, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Sudden cessation of fluoxetine before alcohol drinking reinstatement alters microglial morphology and TLR4/inflammatory neuroadaptation in the rat brain. *Brain Struct Funct*. 2021 Jul 8. doi: 10.1007/s00429-021-02321-9. Epub ahead of print. PMID: 34236532.
170. Crews FT, Vetreno RP. Chapter Ten - Neuroimmune Basis of Alcoholic Brain Damage. En: Cui C, Shurtleff D, Harris RA, editores. *International Review of Neurobiology* [Internet]. Academic Press; 2014. p. 315-57. (Neuroimmune Signaling in Drug Actions and Addictions; vol. 118). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012840000105>
171. Ray LA, Roche DJO, Heinzerling K, Shoptaw S. Chapter Twelve - Opportunities for the Development of Neuroimmune Therapies in Addiction. En: Cui C, Shurtleff D, Harris RA, editores. *International Review of Neurobiology* [Internet]. Academic Press; 2014. p. 381-401. (Neuroimmune Signaling in Drug Actions and Addictions; vol. 118). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012840000129>
172. Cabral GA, Jamerson M. Chapter Eight - Marijuana Use and Brain Immune Mechanisms. En: Cui C, Shurtleff D, Harris RA, editores. *International Review of Neurobiology* [Internet]. Academic Press; 2014. p. 199-230. (Neuroimmune Signaling in Drug Actions and Addictions; vol. 118). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012840000087>
173. Vengeliene V, Bilbao A, Spanagel R (2014) The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol*. 48(3): 313-20.
174. Suárez J, Khom S, Alén F, Natividad LA, Varodayan FP, Patel RR, Kirson D, Arco R, Ballesta A, Bajo M, Rubio L, Martín-Fardon R, Rodríguez de Fonseca F, Roberto M. Cessation of fluoxetine treatment increases alcohol seeking during relapse and dysregulates endocannabinoid and glutamatergic signaling in the central amygdala. *Addict Biol*. 2020 Sep;25(5):e12813. doi: 10.1111/adb.12813. Epub 2019 Jul 24. PMID: 31339221.
175. June HL, Gilpin NW (2010) Operant self-administration models for testing the neuropharmacological basis of ethanol consumption in rats. *Curr Protoc Neurosci*. Chapter 9: Unit-9.12.26.
176. Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 6th ed. New York, NY: Academic Press; Elsevier. 2007.
177. Serrano A, Rivera P, Pavón FJ, Decara J, Suarez J, Rodriguez de Fonseca F, Parsons LH (2012) Differential effects of single versus repeated alcohol withdrawal on the expression of endocannabinoid system-related genes in the rat amygdala. *Alcohol Clin Exp Res*. 36: 984-994.
178. Karperien, A., Ahammer, H., and Jelinek, H. F. (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front. Cell. Neurosci*. 7, 1-18.
179. Neupane SP. Neuroimmune Interface in the Comorbidity between Alcohol Use Disorder and Major Depression. *Front Immunol*. 2016 Dec 27;7:655. doi: 10.3389/fimmu.2016.00655. PMID: 28082989; PMCID: PMC5186784.

BIBLIOGRAFÍA

180. Erickson EK, Grantham EK, Warden AS, Harris RA. Neuroimmune signaling in alcohol use disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2019 Feb;177:34-60. doi: 10.1016/j.pbb.2018.12.007. Epub 2018 Dec 24. PMID: 30590091; PMCID: PMC6946054.
181. Torrens M, Fonseca F, Mateu G, Farré M. Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. A systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Depend.* 2005 Apr 4;78(1):1-22. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004. Epub 2004 Nov 11. PMID: 15769553.
182. Alboni S, Poggini S, Garofalo S, Milior G, El Hajj H, Lecours C, Girard I, Gagnon S, Boisjoly-Villeneuve S, Brunello N, Wolfer DP, Limatola C, Tremblay MÈ, Maggi L, Branchi I. Fluoxetine treatment affects the inflammatory response and microglial function according to the quality of the living environment. *Brain Behav Immun.* 2016 Nov;58:261-271. doi: 10.1016/j.bbi.2016.07.155. Epub 2016 Jul 27. PMID: 27474084.
183. Alboni S, van Dijk RM, Poggini S, Milior G, Perrotta M, Drenth T, Brunello N, Wolfer DP, Limatola C, Amrein I, Cirulli F, Maggi L, Branchi I. Fluoxetine effects on molecular, cellular and behavioral endophenotypes of depression are driven by the living environment. *Mol Psychiatry.* 2017 Apr;22(4):552-561. doi: 10.1038/mp.2015.142. Epub 2015 Sep 15. Erratum in: *Mol Psychiatry.* 2017 Apr;22(4):635. PMID: 26645631; PMCID: PMC5378807.
184. Chen CY, Yeh YW, Kuo SC, Liang CS, Ho PS, Huang CC, Yen CH, Shyu JF, Lu RB, Huang SY. Differences in immunomodulatory properties between venlafaxine and paroxetine in patients with major depressive disorder. *Psychoneuroendocrinology.* 2018 Jan;87:108-118. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.10.009. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29055264.
185. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S (2004) Microglia/macrophagespecific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *J Neurochem* 88:844–856. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02213.x>
186. Ehrlich D, Pirchl M, Humpel C. Effects of long-term moderate ethanol and cholesterol on cognition, cholinergic neurons, inflammation, and vascular impairment in rats. *Neuroscience.* 2012 Mar 15;205:154-66. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.054. Epub 2012 Jan 5. PMID: 22244974; PMCID: PMC3314917.
187. Saito M, Chakraborty G, Mao RF, Paik SM, Vadasz C, Saito M. Tau phosphorylation and cleavage in ethanol-induced neurodegeneration in the developing mouse brain. *Neurochem Res.* 2010 Apr;35(4):651-9. doi: 10.1007/s11064-009-0116-4. Epub 2010 Jan 5. PMID: 20049527; PMCID: PMC2848126.
188. Qin L, Crews FT. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2012 Jan 12;9:5. doi: 10.1186/1742-2094-9-5. PMID: 22240163; PMCID: PMC3271961.
189. Qin L, Crews FT. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation.* 2012 Jun 18;9:130. doi: 10.1186/1742-2094-9-130. PMID: 22709825; PMCID: PMC3412752.
190. Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K. Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of



BIBLIOGRAFÍA

- microglia phenotype. *Neurobiol Dis.* 2013 Jun;54:239-51. doi: 10.1016/j.nbd.2012.12.016. Epub 2013 Jan 8. PMID: 23313316; PMCID: PMC3629000.
191. Zhao YN, Wang F, Fan YX, Ping GF, Yang JY, Wu CF. Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav Brain Res.* 2013 Jan 1;236(1):270-282. doi: 10.1016/j.bbr.2012.08.052. Epub 2012 Sep 5. PMID: 22985845.
192. Ward RJ, Colivicchi MA, Allen R, Schol F, Lallemand F, de Witte P, Ballini C, Corte LD, Dexter D. Neuro-inflammation induced in the hippocampus of 'binge drinking' rats may be mediated by elevated extracellular glutamate content. *J Neurochem.* 2009 Dec;111(5):1119-28. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06389.x. Epub 2009 Sep 18. PMID: 19765190.
193. McClain JA, Morris SA, Deeny MA, Marshall SA, Hayes DM, Kiser ZM, Nixon K. Adolescent binge alcohol exposure induces long-lasting partial activation of microglia. *Brain Behav Immun.* 2011 Jun;25 Suppl 1(Suppl 1):S120-8. doi: 10.1016/j.bbi.2011.01.006. Epub 2011 Jan 22. PMID: 21262339; PMCID: PMC3098298.
194. Kane CJ, Phelan KD, Han L, Smith RR, Xie J, Douglas JC, Drew PD. Protection of neurons and microglia against ethanol in a mouse model of fetal alcohol spectrum disorders by peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists. *Brain Behav Immun.* 2011 Jun;25 Suppl 1(Suppl 1):S137-45. doi: 10.1016/j.bbi.2011.02.016. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21376806; PMCID: PMC3104506.
195. Cruz C, Meireles M, Silva SM. Chronic ethanol intake induces partial microglial activation that is not reversed by long-term ethanol withdrawal in the rat hippocampal formation. *Neurotoxicology.* 2017 May;60:107-115. doi: 10.1016/j.neuro.2017.04.005. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28408342.
196. Beynon SB, Walker FR. Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience.* 2012 Dec 6;225:162-71. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.029. Epub 2012 Jul 20. PMID: 22824429.
197. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996 Aug;19(8):312-8. doi: 10.1016/0166-2236(96)10049-7. PMID: 8843599.
198. Lier J, Streit WJ, Bechmann I. Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells.* 2021 Aug 28;10(9):2236. doi: 10.3390/cells10092236. PMID: 34571885; PMCID: PMC8464670.
199. Soltys Z, Ziaja M, Pawłński R, Setkiewicz Z, Janeczko K. Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. *J Neurosci Res.* 2001 Jan 1;63(1):90-7. doi: 10.1002/1097-4547(20010101)63:1<90::AID-JNR11>3.0.CO;2-9. PMID: 11169618.
200. Ueno M, Yamashita T. Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Curr Opin Neurobiol.* 2014 Aug;27:8-15. doi: 10.1016/j.conb.2014.02.004. Epub 2014 Mar 5. PMID: 24607651.
201. Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, Nilsson M. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the

BIBLIOGRAFÍA

- mechanisms. *Brain Behav Immun*. 2014 Mar;37:1-14. doi: 10.1016/j.bbi.2013.12.010. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412599.
202. Crews FT, Walter TJ, Coleman LG Jr, Vetreno RP. Toll-like receptor signaling and stages of addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2017 May;234(9-10):1483-1498. doi: 10.1007/s00213-017-4560-6. Epub 2017 Feb 17. PMID: 28210782; PMCID: PMC5420377.
203. Fernandez-Lizarbe S, Montesinos J, Guerri C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J Neurochem*. 2013 Jul;126(2):261-73. doi: 10.1111/jnc.12276. Epub 2013 May 8. PMID: 23600947.
204. Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C. Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol*. 2009 Oct 1;183(7):4733-44. doi: 10.4049/jimmunol.0803590. Epub 2009 Sep 14. PMID: 19752239.
205. Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 2009 Mar-Apr;44(2):115-27. doi: 10.1093/alcalc/agn079. Epub 2008 Oct 21. PMID: 18940959; PMCID: PMC2948812.
206. Crews FT, Zou J, Qin L. Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain Behav Immun*. 2011 Jun;25 Suppl 1(Suppl 1):S4-S12. doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.003. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21402143; PMCID: PMC3552373.
207. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8514-9. doi: 10.1073/pnas.1432609100. Epub 2003 Jun 24. PMID: 12824464; PMCID: PMC166260.
208. Puddephatt JA, Irizar P, Jones A, Gage SH, Goodwin L. Associations of common mental disorder with alcohol use in the adult general population: a systematic review and meta-analysis. *Addiction*. 2021 Nov 2. doi: 10.1111/add.15735. Epub ahead of print. PMID: 34729837.
209. Rahman S, Alzarea S. Glial mechanisms underlying major depressive disorder: Potential therapeutic opportunities. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2019;167:159-178. doi: 10.1016/bs.pmbts.2019.06.010. Epub 2019 Jul 13. PMID: 31601403.
210. Sild M, Ruthazer ES, Booij L. Major depressive disorder and anxiety disorders from the glial perspective: Etiological mechanisms, intervention and monitoring. *Neurosci Biobehav Rev*. 2017 Dec;83:474-488. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.09.014. Epub 2017 Sep 14. PMID: 28918359.
211. Torres-Platas SG, Cruceanu C, Chen GG, Turecki G, Mechawar N. Evidence for increased microglial priming and macrophage recruitment in the dorsal anterior cingulate white matter of depressed suicides. *Brain Behav Immun*. 2014 Nov;42:50-9. doi: 10.1016/j.bbi.2014.05.007. Epub 2014 May 20. PMID: 24858659.
212. Tomaz VS, Chaves Filho AJM, Cordeiro RC, Jucá PM, Soares MVR, Barroso PN, Cristino LMF, Jiang W, Teixeira AL, de Lucena DF, Macedo DS. Antidepressants of different classes cause distinct behavioral and brain pro- and anti-inflammatory changes in mice submitted to an inflammatory model of depression. *J Affect Disord*. 2020 May 1;268:188-200. doi: 10.1016/j.jad.2020.03.022. Epub 2020 Mar 6. PMID: 32174477.

BIBLIOGRAFÍA

213. Kreisel T, Frank MG, Licht T, Reshef R, Ben-Menachem-Zidon O, Baratta MV, Maier SF, Yirmiya R. Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive-like behavior and suppressed neurogenesis. *Mol Psychiatry*. 2014 Jun;19(6):699-709. doi: 10.1038/mp.2013.155. Epub 2013 Dec 17. PMID: 24342992.
214. Beurel E, Toups M, Nemeroff CB. The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron*. 2020 Jul 22;107(2):234-256. doi: 10.1016/j.neuron.2020.06.002. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32553197; PMCID: PMC7381373.
215. Hannestad J, DellaGioia N, Bloch M. The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis. *Neuropsychopharmacology*. 2011 Nov;36(12):2452-9. doi: 10.1038/npp.2011.132. Epub 2011 Jul 27. PMID: 21796103; PMCID: PMC3194072.
216. Kim JW, Kim YK, Hwang JA, Yoon HK, Ko YH, Han C, Lee HJ, Ham BJ, Lee HS. Plasma Levels of IL-23 and IL-17 before and after Antidepressant Treatment in Patients with Major Depressive Disorder. *Psychiatry Investig*. 2013 Sep;10(3):294-9. doi: 10.4306/pi.2013.10.3.294. Epub 2013 Sep 16. PMID: 24302954; PMCID: PMC3843023.
217. Yoshimura R, Hori H, Ikenouchi-Sugita A, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J. Higher plasma interleukin-6 (IL-6) level is associated with SSRI- or SNRI-refractory depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2009 Jun 15;33(4):722-6. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.03.020. Epub 2009 Mar 28. PMID: 19332097.
218. Tynan RJ, Weidenhofer J, Hinwood M, Cairns MJ, Day TA, Walker FR. A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun*. 2012 Mar;26(3):469-79. doi: 10.1016/j.bbi.2011.12.011. Epub 2012 Jan 11. PMID: 22251606.
219. Horowitz MA, Wertz J, Zhu D, Cattaneo A, Musaelyan K, Nikkheslat N, Thuret S, Pariante CM, Zunszain PA. Antidepressant compounds can be both pro- and anti-inflammatory in human hippocampal cells. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2014 Oct 31;18(3):pyu076. doi: 10.1093/ijnp/pyu076. PMID: 25522414; PMCID: PMC4360247.
220. Lu Y, Ho CS, Liu X, Chua AN, Wang W, McIntyre RS, Ho RC. Chronic administration of fluoxetine and pro-inflammatory cytokine change in a rat model of depression. *PLoS One*. 2017 Oct 19;12(10):e0186700. doi: 10.1371/journal.pone.0186700. PMID: 29049348; PMCID: PMC5648231.
221. Zhang X, Yin Y, Yue L, Gong L. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors Aggravate Depression-Associated Dry Eye Via Activating the NF- κ B Pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019 Jan 2;60(1):407-419. doi: 10.1167/iovs.18-25572. PMID: 30695093.
222. Kisby BR, Farris SP, McManus MM, Varodayan FP, Roberto M, Harris RA, Ponomarev I. Alcohol Dependence in Rats Is Associated with Global Changes in Gene Expression in the Central Amygdala. *Brain Sci*. 2021 Aug 29;11(9):1149. doi: 10.3390/brainsci11091149. PMID: 34573170; PMCID: PMC8468792.

BIBLIOGRAFÍA

223. Alvarez Cooper I, Beecher K, Chehrehasa F, Belmer A, Bartlett SE. Tumour Necrosis Factor in Neuroplasticity, Neurogenesis and Alcohol Use Disorder. *Brain Plast.* 2020 Dec 29;6(1):47-66. doi: 10.3233/BPL-190095. PMID: 33680846; PMCID: PMC7903009.
224. Ayers-Ringler JR, Jia YF, Qiu YY, Choi DS. Role of astrocytic glutamate transporter in alcohol use disorder. *World J Psychiatry.* 2016 Mar 22;6(1):31-42. doi: 10.5498/wjp.v6.i1.31. PMID: 27014596; PMCID: PMC4804266.
225. Suárez J, Rivera P, Aparisi Rey A, Pérez-Martín M, Arrabal S, Rodríguez de Fonseca F, Ruiz de Azua I, Lutz B. Adipocyte cannabinoid CB1 receptor deficiency alleviates high fat diet-induced memory deficit, depressive-like behavior, neuroinflammation and impairment in adult neurogenesis. *Psychoneuroendocrinology.* 2019 Dec;110:104418. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.104418. Epub 2019 Aug 23. PMID: 31491589.
226. Silva-Peña D, Rivera P, Alén F, Vargas A, Rubio L, García-Marchena N, Pavón FJ, Serrano A, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Oleylethanolamide Modulates BDNF-ERK Signaling and Neurogenesis in the Hippocampi of Rats Exposed to Δ^9 -THC and Ethanol Binge Drinking During Adolescence. *Front Mol Neurosci.* 2019 Apr 24;12:96. doi: 10.3389/fnmol.2019.00096. PMID: 31068789; PMCID: PMC6491684.
227. Gunner G, Cheadle L, Johnson KM, Ayata P, Badimon A, Mondo E, Nagy MA, Liu L, Bemiller SM, Kim KW, Lira SA, Lamb BT, Tapper AR, Ransohoff RM, Greenberg ME, Schaefer A, Schafer DP. Sensory lesioning induces microglial synapse elimination via ADAM10 and fractalkine signaling. *Nat Neurosci.* 2019 Jul;22(7):1075-1088. doi: 10.1038/s41593-019-0419-y. Epub 2019 Jun 17. PMID: 312
228. Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia.* 2002 Mar 15;37(4):314-27. PMID: 11870871.
229. Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR-1-expressing microglia. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1628-35. PMID: 10415068.
230. Zujovic V, Benavides J, Vigé X, Carter C, Taupin V. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia.* 2000 Feb 15;29(4):305-15. PMID: 10652441.
231. Ma Z, Wang W, Wang T, Xu W, Qu W, Huang Z, Hong Z. Ethanol Induces Sedation and Hypnosis via Inhibiting Histamine Release in Mice. *Neurochem Res.* 2019 Jul;44(7):1764-1772. doi: 10.1007/s11064-019-02813-5. Epub 2019 May 15. PMID: 31093904.

ANEXO

Tabla 5 Anexo. Interacción y efectos del consumo de alcohol (sacarina frente etanol) y tratamiento (vehículo frente fluoxetina) en los parámetros morfométricos de las células microgliales que expresan el marcador IBA-1.

Parámetros Morfométricos	ANOVA De 2 vías	Corteza Prefrontal (PrL)	Estriado (Str)	Amígdala Basolateral (BLA)	Hipocampo Dorsal (Región CA1)
Dimensión Fractal (D)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> $F_{1,196}=4,88; P<0,05$ <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=5,69; P<0,02$ $F_{1,196}=5,51; P<0,02$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=10,2; P<0,002$ <i>ns</i>
Lacunaridad (Λ)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> $F_{1,196}=12,1; P<0,001$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=19,3; P<0,000$ $F_{1,196}=21,5; P<0,000$ $F_{1,196}=26,3; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=4,51; P<0,05$ <i>ns</i> <i>ns</i>
Cell area (CA)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> $F_{1,196}=7,27; P<0,01$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=13,8; P<0,001$ <i>ns</i> $F_{1,196}=15,1; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=25,4; P<0,000$ <i>ns</i>
Perímetro Celular (CP)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> $F_{1,196}=7,67; P<0,01$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=15,8; P<0,000$ <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=4,80; P=0,03$ $F_{1,196}=7,91; P<0,004$ <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=5,14; P<0,05$
Circularidad Celular (CC)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> $F_{1,196}=9,42; P<0,01$ <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=14,8; P<0,001$	$F_{1,196}=52,2; P<0,000$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=3,98; P<0,05$ $F_{1,196}=14,1; P<0,001$ <i>ns</i>
Área del Polígono Convexo (CHA)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=27,2; P<0,000$ $F_{1,196}=8,04; P<0,005$ $F_{1,196}=3,1; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=11,6; P<0,001$ $F_{1,196}=6,54; P<0,02$
Densidad (d)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=11,1; P<0,001$ $F_{1,196}=29,8; P<0,000$ $F_{1,196}=14,3; P<0,001$	<i>ns</i> $F_{1,196}=8,60; P<0,004$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=11,4; P<0,001$ <i>ns</i> $F_{1,196}=5,41; P<0,03$
Perímetro del Polígono Convexo (CHP)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=28,2; P<0,000$ $F_{1,196}=6,36; P=0,012$ $F_{1,196}=30,7; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=6,96; P<0,01$ $F_{1,196}=6,76; P<0,02$
Rugosidad (R)	Interacción Etanol Tratamiento	$F_{1,196}=4,10; P<0,05$ $F_{1,196}=8,15; P<0,01$ <i>ns</i>	$F_{1,196}=10,7; P<0,002$ $F_{1,196}=17,5; P<0,000$ $F_{1,196}=57,3; P<0,000$	<i>ns</i> $F_{1,196}=33,4; P<0,000$ <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=9,41; P<0,003$ <i>ns</i>
Circularidad del Polígono Convexo (CHC)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=4,45; P<0,05$ <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=34,3; P<0,000$ <i>ns</i>
Relación de Extensión del Polígono Convexo (CHSR)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=32,4; P<0,000$ <i>ns</i>
Diámetro del Círculo Limitante (BCD)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=6,10; P<0,05$	$F_{1,196}=23,7; P<0,000$ <i>ns</i> $F_{1,196}=24,5; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=6,96; P<0,01$
Extensión Máxima a través del Polígono Convexo (MSACH)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=6,16; P<0,05$	$F_{1,196}=23,1; P<0,000$ <i>ns</i> $F_{1,196}=23,9; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=6,74; P<0,02$
Cociente entre Radio Máx. y mín. de los círculos limitantes externo e interno del Polígono Convexo (RCHR)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	$F_{1,196}=7,81; P<0,006$ $F_{1,196}=6,34; P<0,02$ $F_{1,196}=11,6; P<0,001$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=26,3; P<0,000$ <i>ns</i>
Radio Medio (MR)	Interacción Etanol Tratamiento	<i>ns</i> <i>ns</i> $F_{1,196}=4,36; P=0,05$	$F_{1,196}=29,6; P<0,000$ $F_{1,196}=8,92; P<0,004$ $F_{1,196}=30,4; P<0,000$	<i>ns</i> <i>ns</i> <i>ns</i>	<i>ns</i> $F_{1,196}=5,32; P<0,05$ $F_{1,196}=7,59; P<0,01$

