

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE PSICOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Deterioro cognitivo y alcohol: biomarcadores y neurogénesis

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Silva Peña

Directores

Fernando Antonio Rodríguez de Fonseca
Juan Suárez Pérez

Madrid



U N I V E R S I D A D
COMPLUTENSE
M A D R I D

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. _____
con número de DNI/NIE/Pasaporte _____, estudiante en el Programa
de Doctorado _____,
de la Facultad de _____ de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

y dirigida por: _____

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a ____ de _____ de 20__

SILVA PEÑA Firmado digitalmente
por SILVA PEÑA
DANIEL - DANIEL -
80095584Q 80095584Q
Fecha: 2019.04.25
10:11:08 +02'00'

Fdo.: _____

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE PSICOLOGÍA

Departamento de Psicobiología



Facultad de Psicología
UCM



TESIS DOCTORAL

**Deterioro cognitivo y alcohol:
biomarcadores y neurogénesis.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Silva Peña

Madrid, Abril 2019



Deterioro cognitivo y alcohol: biomarcadores y neurogénesis.

Tesis doctoral presentada por Daniel Silva Peña para optar al grado de Doctor en Psicología por la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los directores

Dr. Juan Suárez Pérez

**Prof. Dr. Fernando
Rodríguez de Fonseca**

Este trabajo ha sido financiado por:

- RETICS Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU) (RD16/0017/0001).
- Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (PNSD2015/047).
- ISCIII, MINECO, ERDF-EU (PI16/01374, PI16/01698 y PI16/01953).

Doctor Fernando Rodríguez de Fonseca, profesor titular del departamento de Psicobiología de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid.

Doctor Juan Suárez Pérez, Investigador Miguel Servet II de la Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental del Hospital Regional Universitario de Málaga – Grupo E-01 de Neuropsicofarmacología del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

Certifican:

Que el Licenciado en Farmacia Daniel Silva Peña ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos clínico-experimentales por los cuáles se ha realizado la presente Tesis Doctoral titulada: **Deterioro cognitivo y alcohol: biomarcadores y neurogénesis.**

Considerando que tanto el contenido científico como la presentación de la misma reúnen las condiciones necesarias para su defensa y opción al grado de Doctor.

Y para que conste ante quien proceda firmamos el siguiente certificado.

Málaga, Abril, 2019.

Directores de tesis

Dr. Juan Suárez Pérez

**Prof. Dr. Fernando
Rodríguez de Fonseca**

Yo, Daniel Silva Peña, declaro ser el autor de la presente Tesis Doctoral y trabajo de Investigación realizado en la Unidad de Gestión Clínica de Salud Mental-Neuropsicofarmacología, Instituto de Investigación Biomédica (IBIMA) de Málaga bajo la dirección del Dr. Juan Suárez Pérez y del Prof. Dr. Fernando Rodríguez de Fonseca.

Y para que así conste, firmo el presente certificado.

En Madrid, Abril 2019.

Fdo: Daniel Silva Peña

“Todo es veneno, nada es sin veneno.

Solo la dosis hace el veneno.”

Theophrastus Phillippus Aureolus Bombastus von Hohenheim.

Dedicado a María Dolores Ojeda Luna.

La otra universitaria.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero dar las gracias a Nuria por su ayuda infinita de principio a fin y por hacerme pensar que se podía hacer un doctorado y ser feliz al mismo tiempo. A Fernando, por ser un ejemplo en tantas facetas, despertar mi interés por la investigación y darme esta magnífica oportunidad. Y a Juan Suárez, por las conversaciones sobre ciencia a la hora de la merienda y porque sin él el camino hasta aquí hubiera sido tremendamente más complicado.

A Patxi por su amabilidad durante mi estancia en Madrid. A Patri por pronunciar tan bien mi nombre. A Antonio, a pesar de lo lento que corre, porque sin él no sería la mitad de lo que soy en un laboratorio. Al Juani por nutrirme durante año y medio. A todos los alumnos de prácticas, desde Laura Leone a Gachón y Rubius, por saber combinar responsabilidad y alegría en el laboratorio.

A toda la gente del IBIMA, Juan, Ana, Laura, Javi, Toñi, Pedro, Estela, Luis, Maricarmen y Fabiola, que en algún momento dedicaron parte de su tiempo para que yo pudiera avanzar.

Al área de Psiquiatría del Hospital 12 de Octubre de Madrid y en especial a los pacientes que allí conocí, de quienes me llevo el conocimiento más importante que he obtenido en estos tres años de investigación.

Al Club de ajedrez Blancoynegro, Rober, Jose María y especialmente a Barroso, a la familia Coretti y a cada uno de mis alumnos, por darme una forma tan bonita de ganarme la vida durante el primer año y medio de tesis. Sin ellos habría sido imposible realizarla.

A Lilian Potter, por su magia. A mis padres, por ayudarme siempre en todo. Y por último, a todos aquellos con quien mantuve una larga conversación sobre ciencia y vida, desde mis hermanos a mis amigos dispersos por Extremadura, España y el mundo.

Ha sido magnífico.

Presentación de tesis doctoral en formato publicaciones.

Esta Tesis Doctoral se presenta como compendio de publicaciones originales según la normativa aprobada por la Junta de facultad el 17 de abril de 2015 en el desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero (BOE 10/02/2011) que regula los estudios de doctorado en la UCM (acuerdo de Consejo de Gobierno de 6 de noviembre de 2012, publicado en BOUC 14, de 21/12/2012) que permite la presentación de Tesis Doctorales como compendio de publicaciones.

Este trabajo incluye una introducción general a las publicaciones, un apartado de hipótesis y objetivos en el que se justifica la hipótesis de trabajo y los objetivos de la investigación, una metodología general y específica de los artículos, un apartado de publicaciones en el que se insertan los artículos originales, una discusión general integradora de las mismas y un apartado con conclusiones específicas y generales.

Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, en la línea de investigación del **Deterioro cognitivo y alcohol: Neurogénesis y biomarcadores**, se han realizado los siguientes trabajos de los que han derivado las siguientes publicaciones en las que figuro como autor principal:

1. García-Marchena N, **Silva-Peña D**, Martín-Velasco AI, Villanúa MÁ, Araos P, Pedraz M, Maza-Quiroga R, Romero-Sanchiz P, Rubio G, Castilla-Ortega E, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Serrano A, Pavón FJ. Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. *PLoS One*. 2017 Nov 6;12(11):e0187634. doi:10.1371/journal.pone.0187634.
2. **Silva-Peña D**, García-Marchena N, Alén F, Araos P, Rivera P, Vargas A, García-Fernández MI, Martín-Velasco AI, Villanúa MÁ, Castilla-Ortega E, Santín L, Pavón FJ, Serrano A, Rubio G, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. *Addict Biol*. 2018 Sep 12. doi: 10.1111/adb.12668.
3. **Silva-Peña D**, Rivera P, Alén F, Vargas A, Rubio L, García-Marchena N, Pavón FJ, Serrano A, Rodríguez de Fonseca F and Suárez J. Oleoylethanolamide 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. 12:96. doi: 10.3389/fnmol.2019.00096

Durante el transcurso de la tesis doctoral, también se ha colaborado en investigaciones asociadas lateralmente al proyecto de la tesis y que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

1. 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 Aug 9. pii: S0006-2952(18)30325-3. doi:0.1016/j.bcp.2018.08.005. PubMed PMID: 30098312.
2. Kossatz E, **Silva-Peña D**, Suárez J, de Fonseca FR, Maldonado R, Robledo P. Octadecylpropyl Sulfamide Reduces Neurodegeneration and Restores the Memory Deficits Induced by Hypoxia-Ischemia in Mice. *Front Pharmacol.* 2018 Apr 19;9:376. doi: 10.3389/fphar.2018.00376. eCollection 2018. PubMed PMID: 29725299; PubMed Central PMCID: PMC5917089.
3. García-Marchena N, Araos PF, Barrios V, Sánchez-Marín L, Chowen JA, Pedraz M, Castilla-Ortega E, Romero-Sanchiz P, Ponce G, Gavito AL, Decara J, **Silva-Peña D**, Torrens M, Argente J, Rubio G, Serrano A, de Fonseca FR, Pavón FJ. Plasma Chemokines in Patients with Alcohol Use Disorders: Association of CCL11(Eotaxin-1) with Psychiatric Comorbidity. *Front Psychiatry.* 2017 Jan 18;7:214. doi: 10.3389/fpsy.2016.00214. eCollection 2016. PubMed PMID: 28149283; PubMed Central PMCID: PMC5242327.
4. Rivera P, **Silva-Peña D**, Blanco E, Vargas A, Arrabal S, Serrano A, Pavón FJ, Bindila L, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Oleoylethanolamide restores alcohol-induced inhibition of neuronal proliferation and microglial activity in striatum. *Neuropharmacology.* 2019 Mar 1;146:184-197. doi:10.1016/j.neuropharm.2018.11.037. Epub 2018 Nov 26. PubMed PMID: 30496754.

Índice general

| | |
|---|----|
| 0. Resúmenes | 1 |
| 1. Introducción | 9 |
| 1.1. Epidemiología del alcohol a nivel mundial | 10 |
| 1.2. Epidemiología del alcohol en España | 11 |
| 1.3. El problema del deterioro cognitivo | 14 |
| 1.3.1. Marco general | 14 |
| 1.3.2. Importancia de su estudio | 15 |
| 1.3.3. Obstáculos en el estudio del deterioro cognitivo causado por consumo de alcohol | 15 |
| 1.3.4. Epidemiología del deterioro cognitivo | 17 |
| 1.4. Bases biológicas del deterioro cognitivo en alcohol (I): Conectividad y plasticidad sináptica | 18 |
| 1.5. Bases biológicas del deterioro cognitivo en alcohol (II) : Potenciación a largo plazo (LTP) y Neurogénesis | 19 |
| 1.6. Diagnóstico y seguimiento del trastorno por uso de alcohol: Biomarcadores.. | 22 |
| 1.7. Neurobiología de la enfermedad llamada adicción..... | 23 |
| 1.7.1. Drogas y recompensa..... | 23 |
| 1.7.2. Mecanismo de la neurotoxicidad del alcohol | 26 |
| 1.8. Factores de crecimiento | 29 |
| 1.8.1. El factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) | 29 |
| 1.8.2. La Neurotrofina 3 (NT-3) | 31 |
| 1.8.3. Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1)..... | 32 |
| 1.8.4. La Proteína de Unión a IGF 3. (IGFBP-3) | 34 |
| 1.9. El Sistema endocannabinoide | 35 |
| 1.9.1. Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC) | 36 |
| 1.9.2. Oleiletanolamida (OEA)..... | 37 |
| 2. Hipótesis y objetivos | 39 |
| 2.1. Hipótesis | 40 |
| 2.2. Objetivos | 41 |
| 3. Metodología | 42 |
| 3.1. Diseño general de los experimentos | 43 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Estudio clínico | 44 |
| 3.2.1. Aspectos éticos de los estudios clínicos | 44 |
| 3.2.2. Descripción de la población de estudio | 45 |
| 3.2.3. Criterios de participación | 45 |
| 3.2.4. Criterios de inclusión del grupo alcohol | 45 |
| 3.2.5. Criterios de inclusión del grupo control | 46 |
| 3.2.6. Criterios de exclusión para ambos grupos..... | 46 |
| 3.2.7. Evaluación clínica | 46 |
| 3.2.8. Evaluación neuropsicológica..... | 47 |
| 3.2.9. Obtención y procesamiento de la sangre en humanos..... | 49 |
| 3.3 Diseño de los estudios preclínicos en animales | 50 |
| 3.3.1. Aspectos éticos del estudio preclínico | 50 |
| 3.3.2. Consideraciones generales | 50 |
| 3.3.3. Procedimiento experimental de la exposición a alcohol en modelos animales. | 50 |
| 3.3.3.1. Exposición repetida a etanol tipo atracón..... | 51 |
| 3.3.3.2. Exposición continuada a alcohol por libre elección (bottle choice) | 52 |
| 3.3.4. Pruebas de comportamiento en modelo animal..... | 54 |
| 3.3.4.1 Laberinto en Y | 54 |
| 3.3.4.2 Test de reconocimiento de objetos | 55 |
| 3.4. Determinación de parámetros bioquímicos | 55 |
| 3.4.1. Cuantificación de factores neurotróficos circulantes en humano y rata..... | 55 |
| 3.4.2. Cuantificación de las concentraciones de ARN mensajero en hipocampo de rata (PCR)..... | 56 |
| 3.4.3. Cuantificación de las cantidades de proteína en hipocampo de rata (Western Blot)..... | 57 |
| 3.5. Análisis estadísticos | 57 |
| 3.5.1. Análisis y distribución de medias..... | 58 |
| 3.5.2. Análisis de correlaciones..... | 58 |
| 3.5.3. Análisis de la covarianza..... | 58 |
| 4. Resultados | 59 |
| 4.1 Estudio 1: Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. | 60 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 Estudio 2: Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. | 78 |
| 4.3 Estudio 3: Oleoylethanolamide modulates BDNF-ERK signaling and neurogenesis in the hippocampus of rats exposed to δ 9-THC and ethanol binge drinking at adolescence. | 94 |
| 5. Discusión | 111 |
| 5.1. Consumo de alcohol, factores neurotróficos y deterioro cognitivo: Hallazgos principales. | 112 |
| 5.2. Factores tróficos y comorbilidad psiquiátrica..... | 114 |
| 5.3. BDNF y consumo de alcohol. | 115 |
| 5.4. Deterioro cognitivo y alcohol: nivel educativo y otros factores sociodemográficos. | 117 |
| 5.5. Otros factores tróficos relacionados con el consumo de alcohol: NT-3, IGF-1, IGF-2, IGFBP-3. | 120 |
| 5.6. Efecto del consumo de alcohol en el hipocampo: estudio preclínico. | 121 |
| 5.7. Efecto de ciertas sustancias exógenas sobre el sistema de señalización de neurotrofinas: OEA y THC..... | 123 |
| 5.8. Relación entre los niveles endógenos de OEA y BDNF. | 125 |
| 6. Conclusiones y futuras líneas de investigación | 127 |
| 6.1. Conclusiones..... | 128 |
| 6.2. Futuras líneas de investigación relacionadas con el presente trabajo | 130 |
| 7. Anexos | 131 |
| 8. Referencias bibliográficas | 138 |

Relación de tablas y figuras

| | |
|---|-----|
| Figura 1: Admisiones a tratamiento en programas de atención a pacientes de Trastorno por Uso de Alcohol..... | 3 |
| Tabla 1: Prevalencia de consumo de alcohol entre la población de 15-64 años según sexo y edad (porcentajes) España, 2015..... | 4 |
| Figura 2: Prevalencia de intoxicaciones etílicas (borracheras) en los últimos 12 meses en la población de 15-64 años según sexo y edad (porcentajes) España, 2015..... | 5 |
| Figura 3: Esquema de un corte sagital del cerebro de un roedor adulto..... | 13 |
| Figura 4: Circuito de recompensa en cerebro y acciones de las diferentes drogas de abuso..... | 17 |
| Figura 5: Cascada de señalización de BDNF desde la unión a su receptor (TrkB) hasta su acción en la célula..... | 22 |
| Figura 6: Cascada de señalización de Insulina, IGF-1 e IGF-2..... | 25 |
| Figura 7: Esquema general del diseño experimental..... | 36 |
| Tabla 2: Distribución de la población examinada según su puntuación FAB..... | 40 |
| Figura 8: Distribución de los cinco grupos en el experimento de consumo en atracción de alcohol..... | 43 |
| Figura 9: Diseño experimental: exposición repetida a etanol tipo atracción..... | 44 |
| Figura 10: Distribución de los grupos en el experimento de exposición continuada al alcohol (Bottle Choice)..... | 45 |
| Figura 11: Diseño experimental: exposición continuada a alcohol por libre elección (Bottle choice)..... | 46 |
| Figura 12: Diagrama resumen del eje de la investigación..... | 112 |
| Tabla 3: Datos sociodemográficos (Población Estudio 2)..... | 117 |
| Tabla 4: Puntuación FAB según nivel educativo (Población Estudio 2)..... | 119 |
| Figura 13: Correlación entre niveles endógenos de BDNF y OEA..... | 126 |

Abreviaturas

2-AG: 2 - Araquidonilglicerol

ATV: Área tegmental ventral

AUD: Alcohol use disorder

AUDIT: Alcohol Use Disorders Identification Test

BDNF: Brain derived Nerve Factor

DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Version IV

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FAB: Frontal Assessment Battery

GABA: Ácido Gamma amino butírico

HRP: Horse Radish Peroxidase

IGF: Insulin-like Growth Factor

IGFBP-3: Insulin-like Growth Factor Binding Protein

IMC: Índice de Masa Corporal

MFE: Memory Failure Everyday

NGF: Nerve Growth Factor

NMDA: N-metil-D-aspartato

NT-3: Neurotrofina 3

OEA: Oleiletanolamida

OEDT: Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías

PPAR: Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)

PND: Post Natal Day

PNSD: Plan Nacional Sobre Drogas

PRISM: Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders

SEC: Sistema Endocannabinoide

SGZ: Zona subgranular (del giro dentado)

SVZ: Zona subventricular (de los ventrículos laterales)

TGF: Tumoral growth factor

THC: Tetrahidrocannabinol

TLR4: Receptor tipo Toll- 4

TRK: Tropomyosin related kinase

TUA: Trastorno por uso de Alcohol

TUS: Trastorno por uso de sustancias

WB: Western Blot

0. Resúmenes

Deterioro cognitivo y alcohol: biomarcadores y neurogénesis.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo avanzar un paso más en el conocimiento del déficit cognitivo derivado del trastorno por uso de alcohol y en los mecanismos neurobiológicos que lo producen. La finalidad última de este trabajo es contribuir al progreso de las estrategias terapéuticas existentes para esta problemática y así ofrecer una mejoría en la calidad de vida de aquellas personas que sufran dicha patología.

Para alcanzar este ambicioso objetivo se ha abordado la cuestión desde dos ámbitos, el clínico y el preclínico, confluyendo ambos en el análisis molecular de los datos obtenidos. En la parte clínica del estudio se contó con la participación de una cohorte de pacientes diagnosticados de trastorno por uso de alcohol (TUA), a la que se realizó una batería de evaluación neuropsicológica y se extrajo una muestra biológica para correlacionar los parámetros clínicos evaluados y los factores neurotróficos presentes en sangre. Es conveniente resaltar que los pacientes de estudio debían de presentar un período mínimo de abstinencia de un mes, de modo que los cambios descritos en las publicaciones son de carácter persistente y no provocados por la intoxicación aguda. En una subcohorte de estos pacientes se evaluó la presencia de deterioro cognitivo. En la parte preclínica del estudio, se empleó un modelo animal que reprodujera el consumo de alcohol humano y se analizó el impacto de la ingesta alcohólica a nivel cognitivo y su repercusión sobre mecanismos tisulares relacionados con la actuación de los factores de crecimiento evaluados a nivel preclínico. Finalmente, tras el procesamiento de muestras y el análisis estadístico de los datos, se redactaron los resultados en forma de artículos científicos que han sido publicados en revistas de alto impacto.

El primer trabajo expone la disminución de la concentración de ciertos factores tróficos que presentaron los pacientes con trastorno por uso de alcohol. Los factores que más afectados se vieron son BDNF (brain derived neurotrophic factor) e IGF-1 (insulin like growth factor), implicados en procesos cerebrales directamente relacionados con las capacidades cognitivas como la neurogénesis, la proliferación celular y la supervivencia neuronal. Esta disminución, además de ratificar las alteraciones bioquímicas que

produce el consumo sobre factores directamente relacionados con la cognición, convierte a BDNF e IGF-1 en potenciales biomarcadores de la adicción al consumo de alcohol.

El segundo trabajo profundiza en los efectos del consumo de alcohol en la alteración de la concentración plasmática de los factores tróficos, principalmente de BDNF y NT-3. Se corrobora la disminución de neurotrofinas producto del consumo excesivo de alcohol y se descubre una correlación entre los niveles de BDNF y el déficit en el desempeño de tareas de función ejecutiva y memoria en los pacientes estudiados. Estas habilidades fueron examinadas mediante las pruebas de evaluación neuropsicológica FAB (Frontal Assessment Battery) y MFE (Memory Failures Everyday). Además, estas alteraciones fueron confirmadas posteriormente en un modelo animal, tanto a nivel comportamental mediante la prueba de reconocimiento de objetos, como a nivel neurobiológico mediante datos de expresión génica e inmunohistoquímica. Como resultado de estos experimentos, se constató la existencia de una relación entre el deterioro cognitivo y los factores tróficos.

En el tercer estudio, exclusivamente preclínico, se intentó avanzar en el conocimiento del impacto de la asociación alcohol-cannabis, el policonsumo más frecuente en seres humanos jóvenes, mediante la utilización de un modelo animal de consumo en atracción asociado a la administración del principal componente psicoactivo del cannabis Δ^9 -THC (delta-9-tetrahidrocannabinol). Con vistas a evaluar un posible mecanismo de defensa, y en base a estudios previos del grupo, se administró la OEA (Oleiletanolamida), un agonista natural del receptor PPAR α , y se evaluó su capacidad para contrarrestar las acciones del alcohol tanto en deterioro cognitivo como en los cambios tisulares, analizando su impacto sobre BDNF y su cascada de señalización. La co-administración de Δ^9 -THC y OEA revirtió la disminución de los niveles plasmáticos de BDNF por el consumo de alcohol, además de tener un enorme impacto en la expresión génica de factores neurotróficos y neurogénicos en el hipocampo. Por otro lado, el Δ^9 -THC provocó una disminución en la supervivencia celular en el hipocampo y un empeoramiento en la memoria espacial de los animales, efectos que fueron parcialmente modulados por OEA.

El alcohol afecta a los niveles de BDNF, lo que lo posiciona como un potencial biomarcador de consumo, como ya se ha descrito para la OEA. Por otro lado, los

pacientes con trastorno por uso de alcohol presentan un marcado deterioro cognitivo, que está relacionado con una serie de alteraciones neurobiológicas entre las que destaca la desregulación de los niveles de factores tróficos, con el consiguiente impacto a nivel neurogénico. Las futuras líneas de investigación deberán indagar en la posibilidad de regular los sistemas neurogénicos implicados en los procesos de aprendizaje. Para ello, sustancias como BDNF y OEA surgen como potenciales tratamientos en la patología de la adicción.

Cognitive impairment and alcohol: biomarkers and neurogenesis.

The present Doctoral Thesis aims to raise new knowledge about alcohol induced cognitive deficits, and its neurobiological basis. The main goal of this work is to contribute to the upgrade of the current therapeutical strategies, offering better life quality to those affected by the mentioned pathology.

To reach this ambitious target, we treated the problem from two different ambits: clinical and preclinical. Biological and behavioural or sociodemographic data were analysed. Neuropsychological and biochemical data were assessed in an alcohol use disorder (AUD) patients cohort, and clinical and biological parameters like neurotrophic factors were correlated statistically. Is important to mention that patients included in our study must have been at least one month abstinent. Thus, effects described in papers are permanent, not induced by acute ethylic intoxication. In a sub-cohort of these patients, cognitive impairment was assessed. In the preclinical part of the study, an animal model was created to simulate human alcohol consumption. We analysed the effect of alcohol intake in cognition and its consequences on growth factors and brain. Finally, after processing the samples, we fulfilled an exhaustive statistical analysis, and we published three articles in high impact journals.

Our first work show the decrease of neurotrophic factors plasma levels in AUD patients. The most affected factors were BDNF (Brain derived neurotrophic factor) and IGF-1 (Insulin like Growth Factor), which are directly implicated in brain processes and related to cognitive abilities such as neurogenesis, cell survival and proliferation. This decrease confirms the cognition-related molecules alterations induced by alcohol consumption. BDNF and IGF-1 become potential biomarkers of alcohol consumption addiction.

The second article follows the line of the first one, studying the alterations in plasma levels of neurotrophic factors after chronic alcohol consumption, focusing in BDNF and NT-3. Alcohol-induced decrease of neurotrophin levels was confirmed. Moreover, an association between low BDNF levels and impaired memory and frontal cognition was also reported. Cognitive functions were assessed by two different tests: MFE (Memory Failures Everyday) and FAB (Frontal Assessment Battery) respectively.

Besides, these alterations were further explored and confirmed in an animal model. Object recognition test was used as behavioural test and we also analysed hippocampus mRNA expression and immunohistochemistry. As the result of these experiments, we observed a correlation between cognitive impairment and neurotrophic factors.

In the third study, exclusively preclinical, we analyzed the effect of the most common concomitant drug consumption in human: the associated intake of cannabis and alcohol. Through an animal binge drinking model, main psychoactive compound of cannabis, Δ^9 -THC (delta-9-tetrahydrocannabinol), was administered. With the idea of evaluating a possible defense mechanism, and following previous studies of our group, OEA (Oleyletanolamide), a natural PPAR α agonist, was administered. Then. We analyzed its potential to overcome alcohol deleterious actions on cognition and brain, studying its impact on BDNF and its signaling pathways. Concomitant administration of THC and OEA restored plasmatic levels of BDNF, which were decreased by alcohol consumption. Besides, it showed a huge impact on hippocampus, neurotrophic factors and neurogenic factors mRNA expression. Finally, THC led to short-term memory impairment and a decrease in cell survival which was reversed by OEA.

Alcohol alters BDNF levels, which makes it a potential consumption biomarker, as has also been described for OEA. Besides, AUD patients shows a remarkable cognitive impairment, directly related to neurobiological alterations, dysregulation of neurotrophins, and altered levels of neurogenic factors. Future lines of research should delve in the idea of modulating neurogenic systems involved in learning processes. To reach that ambitious aim, BDNF and OEA emerge as potential treatment on addiction and cognitive impairment pathologies.

1. Introducción

1.1. Epidemiología del alcohol a nivel mundial

El alcohol es una sustancia psicoactiva que ha sido ampliamente utilizada por el ser humano durante siglos y en multitud de culturas. Los efectos de esta sustancia sobre el organismo están determinados por el volumen de alcohol y el hábito de consumo. A día de hoy, el consumo nocivo de alcohol es un problema social y sanitario que afecta a un elevado porcentaje de la población. En 2015, la Organización Mundial de la Salud publicó una serie de datos acerca de los efectos del alcohol sobre la salud que nos ayudan a comprender el problema que supone su consumo:

- Cada año, se producen 3,3 millones de muertes en el mundo debido al consumo de alcohol, lo que representa un 5,9% de todas las defunciones.
- El dato anterior resulta más alarmante al relacionarlo con el factor de la edad, ya que el alcohol provoca discapacidad a edades relativamente tempranas. En el grupo etario de 20 a 39 años, un 25% de las defunciones son atribuibles al consumo de alcohol.
- Una proporción importante de la carga de morbilidad y mortalidad atribuibles al uso nocivo del alcohol corresponde a los traumatismos resultantes de accidentes de tránsito, actos de violencia y suicidios.
- Existe una relación causal entre el consumo nocivo de alcohol y una serie de trastornos comportamentales y mentales, además de distintas enfermedades no transmisibles y traumatismos, siendo el uso nocivo de alcohol un factor causal en más de 200 enfermedades y trastornos.
- Recientemente se han determinado relaciones causales entre el consumo nocivo y la incidencia de enfermedades infecciosas tales como la tuberculosis y el VIH/sida.
- Más allá de las consecuencias sanitarias, el consumo nocivo de alcohol provoca pérdidas sociales y económicas importantes, tanto para los individuos consumidores como para la sociedad en su conjunto.
- El consumo de alcohol por parte de una embarazada puede provocar síndrome alcohólico fetal y complicaciones prenatales.

Por todo ello, el alcohol supone un tema de importancia capital en la actualidad social, sanitaria y económica a nivel mundial (1).

1.2. Epidemiología del alcohol en España

En España, el consumo de alcohol es un hecho totalmente arraigado, hasta el punto de que un 93,5% de las personas entre 15 y 64 años afirman haberlo probado alguna vez en su vida. El 77,6% ha consumido alcohol en los últimos 12 meses, el 62,1% en los últimos 30 días y el 9,3% diariamente en los últimos 30 días. Se estima que 1.600.000 personas de 15 a 64 años (1.300.000 hombres y 300.000 mujeres) tienen un consumo de alcohol de riesgo (AUDIT ≥ 8), lo que representa el 5% de la población de este rango de edad (2).

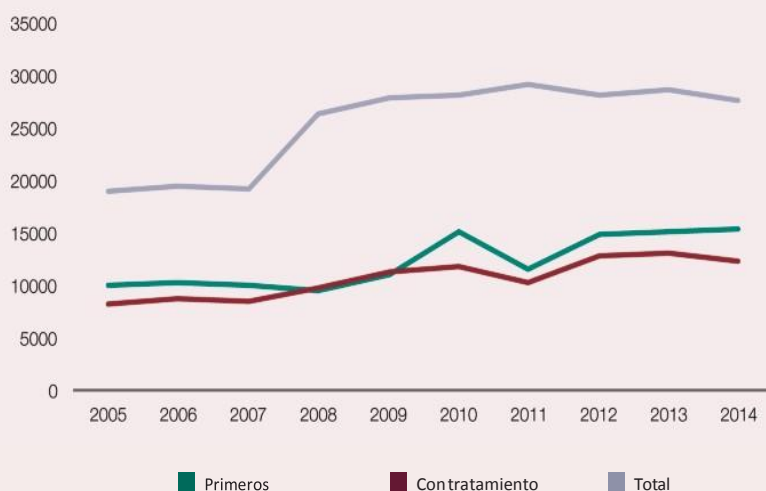
Teniendo en cuenta estos datos, es lógico pensar que su repercusión a nivel económico es también reseñable. Cada español gastó 709,49€ anuales de media durante el año 2016 (3).

En nuestro país, durante el año 2014, se registraron 27.658 admisiones a tratamiento por alcohol, lo que supone un 36% del total de tratamientos por adicción a sustancias (2).

Como observamos en la figura 1, tomada de la encuesta sobre Alcohol y Drogas en España 2015-2016, (EDADES) (4), la tendencia se mantiene invariable desde el año 2008.

Figura 1.

Admisiones a tratamiento en programas de atención a pacientes de trastorno por uso de alcohol.



Extraído de Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España 2015-2016, (EDADES)

Otro dato alarmante y ligado directamente con la aparición de demencia, es el consumo de alcohol en edades comprendidas entre 55 y 64 años. En España, el 19,6% de la población ubicada en este rango de edad afirma consumir alcohol a diario, siendo este dato aún más reseñable en los varones, donde se dispara hasta el 30,2% (2).

Tabla 1.

Prevalencias de consumo de alcohol entre la población de 15-64 años, según sexo y edad (porcentajes). España, 2015.

| | 15-64 | | | 15-24 | | | 25-34 | | | 35-44 | | | 45-54 | | | 55-64 | | |
|------------------------------------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|-------|------|------|
| | Total | H | M | Total | H | M | Total | H | M | Total | H | M | Total | H | M | Total | H | M |
| Alguna vez en la vida | 93,5 | 95,3 | 91,7 | 87,5 | 89,0 | 86,0 | 93,9 | 95,8 | 91,9 | 94,5 | 95,7 | 93,2 | 95,6 | 97,0 | 94,3 | 94,0 | 97,3 | 90,5 |
| Últimos 12 meses | 77,6 | 82,9 | 72,1 | 78,4 | 80,5 | 76,1 | 79,8 | 86,1 | 73,4 | 77,8 | 82,6 | 72,6 | 79,1 | 84,2 | 74,5 | 72,3 | 80,5 | 63,7 |
| Últimos 30 días | 62,1 | 71,3 | 52,8 | 59,5 | 63,8 | 54,9 | 63,1 | 73,0 | 53,2 | 62,5 | 70,6 | 53,8 | 65,2 | 75,3 | 56,1 | 58,7 | 71,8 | 44,9 |
| Diariamente en los últimos 30 días | 9,3 | 14,5 | 4,1 | 1,4 | 2,0 | 0,9 | 4,5 | 7,4 | 1,7 | 7,6 | 11,8 | 3,0 | 12,1 | 18,8 | 6,1 | 19,6 | 30,2 | 8,2 |
| Nunca | 6,5 | 4,7 | 8,3 | 12,5 | 11,0 | 14,0 | 6,1 | 4,2 | 8,1 | 5,5 | 4,3 | 6,8 | 4,4 | 3,0 | 5,7 | 6,0 | 2,7 | 9,5 |

Extraído de Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España 2015-2016 (EDADES)

En la adolescencia, el consumo de alcohol cobra si cabe mayor importancia, ya que al ser un período de formación y desarrollo tanto a nivel psicológico como a nivel fisiológico, las repercusiones de un consumo nocivo pueden llegar a ser críticas. El sistema nervioso de un individuo adolescente no se ha desarrollado aun completamente, por lo que puede ser más vulnerable a la acción de agentes externos que interaccionen directamente con dicho sistema (5).

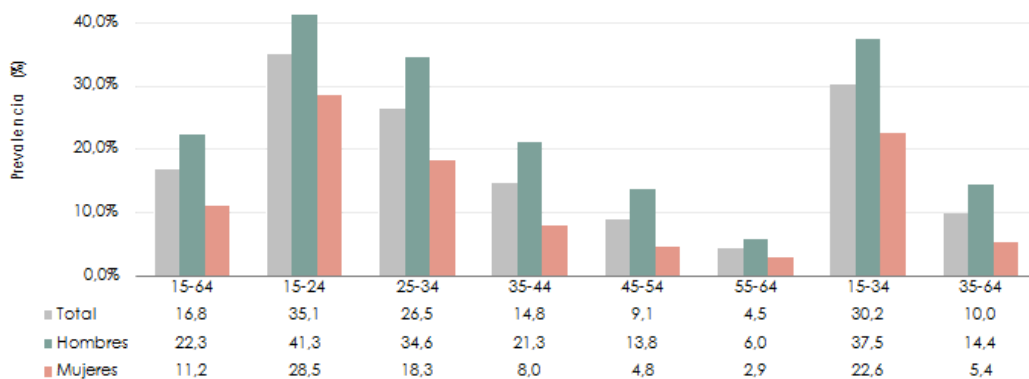
En España, el consumo de alcohol entre los jóvenes es un hecho cotidiano hasta el punto en que, según datos del Observatorio Español de Drogas y Toxicomanías, un 40%

de la población en el grupo etario de 15 a 24 años de edad afirma haber hecho botellón, (definido como “Una reunión masiva de jóvenes de entre 13 y 26 años fundamentalmente, para consumir grandes cantidades de bebida alcohólica que han adquirido previamente en comercios” (6)) y bebido en los últimos 12 meses. Conviene también indicar que el patrón de consumo en atracón o *binge drinking*, muy frecuente en los mencionados botellones, se define según el National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) como el patrón de consumo que eleva la concentración en sangre del individuo a 0,08% o más. Esto comúnmente ocurre cuando un hombre consume 5 o una mujer 4 bebidas en un intervalo de dos horas (7).

Además de estos datos, un 35% de las personas de esta franja de edad, ha sufrido una intoxicación etílica en los últimos 12 meses y hasta un 15% afirma haberse emborrachado en los últimos 30 días (2).

Figura 2.

Prevalencia intoxicaciones etílicas (borracheras) en los últimos 12 meses en la población de 15-64 años según sexo y edad (porcentajes). España, 2015.



Extraído de Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España 2015-2016 (EDADES)

De todos estos datos, se extrae la conclusión de que es necesario un conocimiento más profundo sobre las consecuencias biológicas que el consumo nocivo de alcohol pueda tener sobre la población joven, y así poder establecer la mejor estrategia para el abordaje de la situación.

1.3. El problema del deterioro cognitivo

El consumo abusivo de alcohol puede producir daño neurológico que afecte a las funciones cognitivas. En pacientes con un amplio historial de abuso, el consumo de alcohol puede acabar dando lugar a la encefalopatía de Wernicke, y posteriormente a la demencia alcohólica. Sin embargo, se sabe poco de cómo comienza el deterioro cognitivo asociado al abuso de alcohol y de sus potenciales mecanismos patogénicos.

1.3.1. Marco general

A la hora de hablar de deterioro cognitivo, es fundamental aclarar la nomenclatura actual. En esta tesis, nos guiaremos por las directrices del Manual DSM-V. Dicho manual cataloga la pérdida de las funciones cognitivas como Trastorno Neurocognitivo (TNC). Dentro del TNC, distinguimos entre el TNC mayor, correspondiente con el término demencia empleado en el DSM-IV y que sigue siendo aceptado, y el TNC leve. En pocas palabras, el deterioro cognitivo es el declive de las funciones mentales que, en función de su magnitud, puede calificarse como TNC mayor o TNC leve. Para entender la clínica del deterioro cognitivo, seguiremos un sencillo ejemplo como puede ser memorizar una breve lista de la compra: pan, huevos, arroz. En los casos en los que el individuo encuentre una dificultad adicional en la realización de esta tarea (que comúnmente podía realizar, antes de la aparición del TNC), o necesite de estrategias compensatorias para llevarla a cabo (como puede ser la necesidad de apuntar los tres productos a comprar) se considerará que el TNC es leve. En el caso del TNC mayor, esas tareas son abandonadas totalmente o completadas con la necesidad de ayuda.

Para el diagnóstico del TNC, el manual DSM-V ofrece dos criterios a seguir:

Criterio A: Se basa en dos parámetros, la preocupación acerca de la cognición por parte del propio individuo o de una persona cercana, y el rendimiento menor del esperado en una prueba neuropsicológica objetiva. Serán necesarios tanto el criterio objetivo como el subjetivo puesto que ambos son complementarios.

Criterio B: Hace referencia al nivel de autonomía del individuo en el funcionamiento diario. En el caso del TNC leve, el deterioro cognitivo le provocará sutiles interferencias en el funcionamiento diario, pero mantendrá su autonomía. Sin embargo, una persona

afectada de TNC mayor presentará una disfunción suficientemente grave como para interferir en su autonomía.

1.3.2. Importancia de su estudio

El deterioro cognitivo es actualmente considerado como un problema sanitario de interés mundial, posicionándose como una de las principales enfermedades del siglo XXI. Las previsiones apuntan a un notable aumento de la prevalencia de demencia en los 30 próximos años, llegando a alcanzar la cifra de 131,5 millones de personas afectadas en el año 2050. Por ello, la Organización Mundial de la Salud lanzó un llamamiento en 2012 dando prioridad a la investigación de la demencia y la búsqueda de soluciones efectivas contra ella (8).

Esta situación ha llevado a gobiernos y organizaciones internacionales a desarrollar una respuesta global coordinada para abordar de una manera efectiva la problemática de esta enfermedad y poder afrontar su potente impacto social y económico (8). Teniendo en cuenta que la población goza de una longevidad cada vez mayor y los datos de consumo de alcohol siguen siendo alarmantemente elevados, las generaciones futuras van a experimentar un enorme crecimiento en deterioro cognitivo, tanto si este está relacionado con el consumo de alcohol como si es debido a otras patologías. Por ello, es necesario desarrollar métodos precisos de evaluación y diagnóstico del deterioro cognitivo y su etiología.

1.3.3. Obstáculos en el estudio del deterioro cognitivo causado por consumo de alcohol

Los trastornos cognitivos son un tema complejo de analizar debido a la dificultad para establecer criterios objetivos y marcos comunes en términos de evaluación y diagnóstico, lo que afecta también a su epidemiología y tratamiento.

Una de las clasificaciones que se pueden realizar de los trastornos cognitivos es en base a su etiología. Por ejemplo, estas son las clases de TNC leve que recoge el DSM-V atendiendo a su etiología:

- Debido a degeneración del lóbulo frontotemporal
- Debido a enfermedad por priones
- Debido a etiologías múltiples

- Debido a infección por VIH
- Debido a la enfermedad de Alzheimer
- Debido a la enfermedad de Huntington
- Debido a la enfermedad de Parkinson
- Debido a la enfermedad por cuerpos de Lewy
- Debido a otra afección médica
- Debido a traumatismo cerebral
- Debido a enfermedad vascular leve

Como se puede observar, no existe un epígrafe específico para el TNC leve debido a consumo de sustancias, a pesar de la amplia evidencia científica que existe sobre la relación entre consumo y declive cognitivo y de las escandalosas cifras que arrojan anualmente los estudios sobre consumo de drogas en la población.

El principal problema que presenta el estudio del deterioro cognitivo causado por alcohol es la dificultad para señalar con exactitud la causa del deterioro.

Existe un debate sobre si las deficiencias cognitivas son resultado directo de la acción neurotóxica del alcohol, de otras deficiencias como la de la tiamina o si su carácter es multifactorial, combinando neurotoxicidad y deficiencias nutricionales.

Por otro lado, es prácticamente imposible estandarizar variables tan importantes como la cantidad consumida y el período de consumo, debido a las grandes diferencias entre la población para definir la graduación de las bebidas o los conceptos de consumo lúdico y patológico. Intervienen también aspectos culturales, la variación en los patrones de consumo (atracones, abstinencias, recaídas...), la dificultad del paciente para dar un informe real sobre su consumo, etc (9).

Además, existen otra multitud de variables que podrían explicar el deterioro cognitivo de las personas con TUA (Trastorno por uso de alcohol), como el estilo de vida, el consumo concomitante de otras sustancias de abuso, la comorbilidad psiquiátrica, la presencia de factores de riesgo cardiovascular que pudieran comprometer la circulación a nivel cerebral, etc (10).

Todos estos factores constituyen un obstáculo importante en el estudio y definición del TNC causado por consumo de alcohol.

Por ello, surge la necesidad de establecer marcadores bioquímicos que puedan definir la

situación de deterioro cognitivo asociado a consumo de alcohol. Para ello, hemos tratado de realizar nuestros estudios con el máximo rigor posible, aislando los factores externos que pudieran influir en nuestros resultados y definiendo exactamente el marco de acción en que se desarrolla nuestro trabajo.

1.3.4. Epidemiología del deterioro cognitivo

Como hemos visto en el apartado anterior, existen diferentes causas para el deterioro cognitivo. A día de hoy la mayoría de casos de demencia se atribuyen a los siguientes factores (11):

- Enfermedad de Alzheimer
- Causas vasculares
- Demencia con cuerpos de Lewy

A pesar de la elevada prevalencia de consumo de alcohol y la amplia evidencia científica acerca de sus efectos neurotóxicos, la demencia alcohólica es frecuentemente ignorada o vista simplemente como un factor comórbido (12).

A continuación se exponen algunos de los múltiples estudios que tratan en profundidad la epidemiología del deterioro cognitivo asociado alcohol. Concretamente, nos centraremos en la aparición temprana de deterioro cognitivo en la población con TUA, algo que hemos explorado en nuestro trabajo (13). En un estudio llevado a cabo en Inglaterra sobre el inicio temprano de la demencia se encontró que las demencias causadas por consumo de alcohol representaban un 10% del total (14). Un estudio diferente, realizado en Australia, encontró que el alcohol era la causa principal para el 1,4% de las demencias totales, lo cual ya afecta a miles de personas. Pero el dato más interesante se halló nuevamente al analizar los datos de demencia prematura, ya que en aquellos pacientes que sufrían dicha enfermedad antes de los 65 años, la cifra se disparaba al 22% (15). Hay estudios que han encontrado asociación directa entre deterioro cognitivo y cronicidad y severidad del uso de alcohol (11).

Como podemos ver, y aunque todos los datos apunten a un claro efecto del alcohol como catalizador de los procesos que favorecen aparición del deterioro cognitivo, los porcentajes varían claramente según las variables que hemos señalado anteriormente y que dificultan la regulación del estudio de los TNC causados por consumo de alcohol.

Para ilustrar esto, existen informes de hospitales que establecen el porcentaje de ARD (alcohol- related dementia, por sus siglas en inglés) entre el 10% y el 24% de entre todos los subtipos de demencias, mientras que en los informes de las clínicas neurológicas los ubican entre el 3% y el 5% (11).

No obstante, hay un dato que se repite y sobre el que orientamos nuestro estudio, y es la elevada presencia de un problema que tiene una repercusión importante en la sociedad, la aparición del deterioro cognitivo causado por consumo y sus bases neurobiológicas, que a continuación serán desarrolladas en detalle.

1.4. Bases biológicas del deterioro cognitivo en alcohol (I): Conectividad y plasticidad sináptica

El desarrollo de un deterioro cognitivo inducido por un tóxico como el alcohol presupone su interferencia con los mecanismos de adquisición, almacenamiento y procesamiento de la información en el cerebro. Por tanto, a la hora de buscar mecanismos a través de los cuales el alcohol puede influir en la cognición y su preservación, debemos centrarnos en los mecanismos que gobiernan estos procesos de aprendizaje, memoria y procesamiento cognitivo.

Con más de cien mil millones de neuronas, el cerebro humano representa una inmensa red de procesamiento, almacenamiento y recuerdo de la información. Las neuronas son diferentes al resto de células del cuerpo, por su elevada polarización y especialización. Las neuronas conectan entre sí a través de sinapsis formando redes neuronales. Actualmente, el conocimiento humano indica que la mayoría de las acciones que implican almacenamiento de información tienen lugar en la sinapsis. Al mismo tiempo, las alteraciones sinápticas están relacionadas con multitud de procesos fisiológicos (16). La disposición funcional de la sinapsis, sea ésta química o eléctrica, está regulada por multitud de factores de mantenimiento trófico y de regulación funcional, entre los que se encuentran las señales mediadas por ciertos factores de crecimiento como las neurotrofinas (BDNF), o el IGF-1 y proteínas asociadas como la IGFBP-3, (17) que son objeto de nuestro estudio y serán desarrollados más adelante.

En otras palabras, memoria y aprendizaje están encriptados en los procesos sinápticos que tienen lugar en las redes neuronales de nuestro sistema nervioso y son susceptibles de ser sostenidas por una red de preservación de su integridad funcional mediada por este tipo de señales tróficas.

El concepto de plasticidad sináptica fue establecido por Hebb en 1949. En esta primera definición, Hebb apunta que las experiencias de un organismo pueden modificar la sinapsis, favoreciendo determinadas rutas neuronales y debilitando otras (18). Dicho de otro modo, la plasticidad sináptica se define como los cambios en la robustez de ciertas conexiones neuronales en respuesta a un mayor o menor uso. Los cambios duraderos en la eficacia sináptica están frecuentemente acompañados por modificaciones estructurales y funcionales en las neuronas. Dichas modificaciones pueden suceder en cualquiera de los niveles del proceso sináptico (receptores, neurotransmisores, terminales dendríticos...).

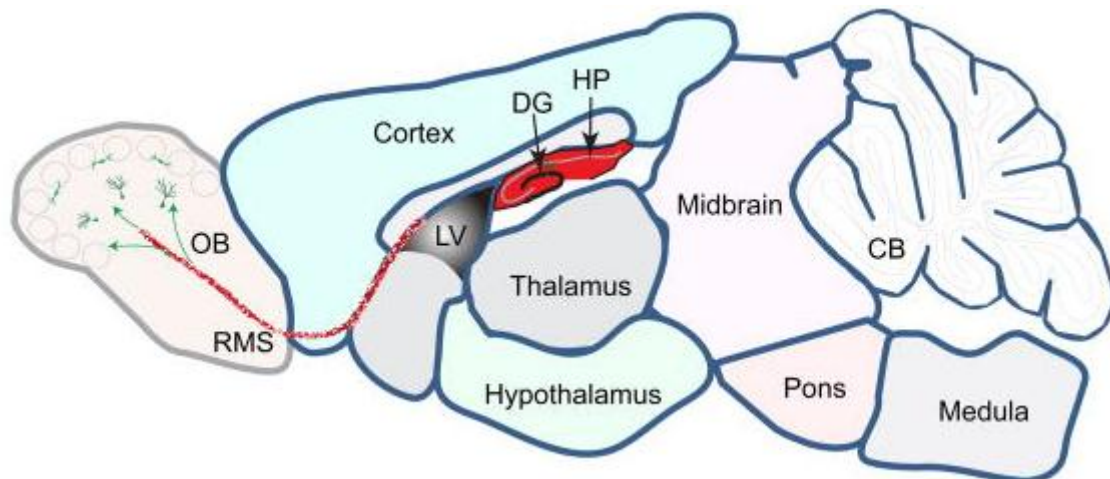
El alcohol ha demostrado provocar importantes cambios en los procesos de plasticidad y conectividad sináptica (19). Dado que los efectos del alcohol difieren en función de la región cerebral estudiada, en la presente Tesis Doctoral nos centraremos en el efecto del consumo de alcohol a nivel de hipocampo, ya que la conectividad y plasticidad sináptica son mecanismos involucrados en aprendizaje y memoria, procesos muy relacionados con dicha región (20). Diversos estudios apuntan a que el consumo de alcohol empeora los procesos de plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo en el hipocampo, lo que podría estar a su vez involucrado en el deterioro de la función cognitiva (21) (22). Por ello, es necesario desarrollar investigaciones que establezcan las bases biológicas del efecto del alcohol sobre los sistemas cerebrales de conectividad y plasticidad.

1.5. Bases biológicas del deterioro cognitivo en alcohol (II) : Potenciación a largo plazo (LTP) y Neurogénesis

A la hora de hablar de las bases neurobiológicas de la memoria y el aprendizaje, es necesario definir algunos de los mecanismos que pueden modificar funcional y estructuralmente a las sinapsis. Entre ellos destacan mecanismos de plasticidad funcional como la potenciación a largo plazo y los mecanismos de plasticidad estructural como la neurogénesis. La potenciación a largo plazo se define como un aumento duradero en la eficacia de la comunicación sináptica entre dos neuronas como consecuencia de una estimulación eléctrica de alta frecuencia. Este ajuste en la eficacia sináptica es el proceso fisiológico que sustenta el aprendizaje y la memoria y fue descrito en primera instancia por los científicos Bliss y Lomo en 1973 (23). No es un mecanismo único ya que existen otros de naturaleza opuesta (depresión perdurable o LTD) o moduladora (Como los mecanismos de comunicación retrógrada sináptica (DSI y DSE: supresión inhibitoria o excitatoria inducida por la despolarización postsináptica).

Por otro lado, uno de los mecanismos reconocidos como capaces de modificar estructuralmente los circuitos cerebrales (incluyendo los cognitivos) es la neurogénesis. Se denomina neurogénesis a la generación de nuevas neuronas funcionales e integradas en el sistema nervioso a partir de precursores neuronales diferenciados a partir de células pluripotenciales. La neurogénesis engloba los procesos de proliferación, migración y diferenciación de los neuroblastos y el establecimiento de nuevas conexiones neuronales (24).

Este proceso de creación de nuevas neuronas se ha atribuido históricamente a la etapa de desarrollo perinatal del sistema nervioso central, donde el cerebro está aún en pleno desarrollo (25). Durante la década de los noventa, se descubrió la existencia de un fenómeno denominado neurogénesis adulta: neuronas de nueva creación formadas en etapas avanzadas de la vida del individuo. Dentro de la neurogénesis adulta, se han descrito dos regiones cerebrales específicas como nichos neurogénicas: la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) de los ventrículos laterales (26).

Figura 3.**Esquema de un corte sagital del cerebro de un roedor adulto.**

En él se muestran las dos áreas donde tiene lugar la neurogénesis adulta: El giro dentado (DG) dentro del hipocampo (HP) y el ventrículo lateral (LV). De él, parten las neuronas supervivientes a lo largo de la denominada ruta de migración rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio (OB), ya que en roedores este órgano es vital para la supervivencia. (26)

Extraído de Song et al., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: Significant answers and questions.

La neurogénesis adulta es un proceso dinámico que está sujeto a modulación a través de diferentes estímulos, ya sean fisiológicos, patológicos o farmacológicos. Por ello, había de ser forzosamente objeto de nuestro estudio, ya que el alcohol ha mostrado ser un agente capaz de influir en la neurogénesis adulta en modelos animales (27) y ésta a su vez está implicada en los procesos de memoria y aprendizaje, mediante la creación de nuevas transmisiones sinápticas y consolidación de las conexiones existentes (28). Los estudios anteriores apuntan a que las alteraciones neurogénicas están asociadas a un declive persistente en las funciones cognitivas y comportamentales. La exposición al alcohol ha demostrado deteriorar gravemente la neurogénesis adulta en el hipocampo, interrumpiendo la proliferación, la supervivencia, la maduración y la diferenciación neuronal en el hipocampo adulto. Estas alteraciones de la neurogénesis hipocámpal han sido ampliamente relacionadas con déficits en las funciones de memoria y aprendizaje (29). Aunque recientemente se ha cuestionado su importancia en humanos adultos (30), hay que recordar que el alcohol puede impactar en los momentos claves del desarrollo cerebral como son la etapa fetal o la adolescencia.

Teniendo en cuenta todas estas bases, nos proponemos analizar la influencia que el alcohol pueda ejercer sobre tres moléculas implicadas en todos los procesos neuronales definidos y que, a su vez, interfieren con el estado cognitivo del individuo.

1.6. Diagnóstico y seguimiento del trastorno por uso de alcohol: Biomarcadores

Los pacientes afectados de trastornos crónicos como el trastorno por uso de alcohol suelen demandar tratamiento cuando la sintomatología orgánica es evidente, lo que supone una fase avanzada de la enfermedad. Sin embargo, el abuso de alcohol podría inducir fenómenos adaptativos en el organismo que indican su actuación tóxica mucho antes de que ésta se haya convertido en una alteración funcional de difícil recuperación. En este sentido, encontrar estas alteraciones y correlacionarlas con el trastorno cognitivo en sus fases iniciales podría ayudar a diagnosticar, prevenir y tratar deterioros posteriores mucho más serios.

Un biomarcador se define como una característica que es objetivamente medida y evaluada como indicativa de un estado biológico, ya sea un proceso fisiológico normal, una situación patológica o una respuesta farmacológica ante una intervención terapéutica (31).

Con la finalidad de proporcionar la estrategia terapéutica más adecuada a los pacientes con problemas de adicciones, consideramos necesario el estudio del sustrato biológico que subyace a los trastornos por uso de sustancias TUS (Trastorno por Uso de Sustancias) y al deterioro cognitivo asociado, con el fin de encontrar pruebas de carácter objetivo que minimicen los márgenes de error a la hora de elaborar tratamientos efectivos en la adicción a sustancias. En el caso del alcohol y el deterioro cognitivo sería muy importante identificar si hay señales biológicas accesibles relacionadas con el funcionamiento cerebral que pudieran utilizarse para medir el daño infligido por el abuso de alcohol.

En este sentido, la señalización mediada por factores de crecimiento como las neurotrofinas afecta directamente a la estructura cerebral, siendo influyentes en los procesos de neurogénesis, sinaptogénesis, neuroinflamación, maduración y proliferación

celular. Por esto, hemos seleccionado las siguientes biomoléculas a estudiar como posibles biomarcadores útiles en el abordaje terapéutico del TUA: BDNF, NT-3, IGF-1 e IGFBP-3.

1.7. Neurobiología de la enfermedad llamada adicción

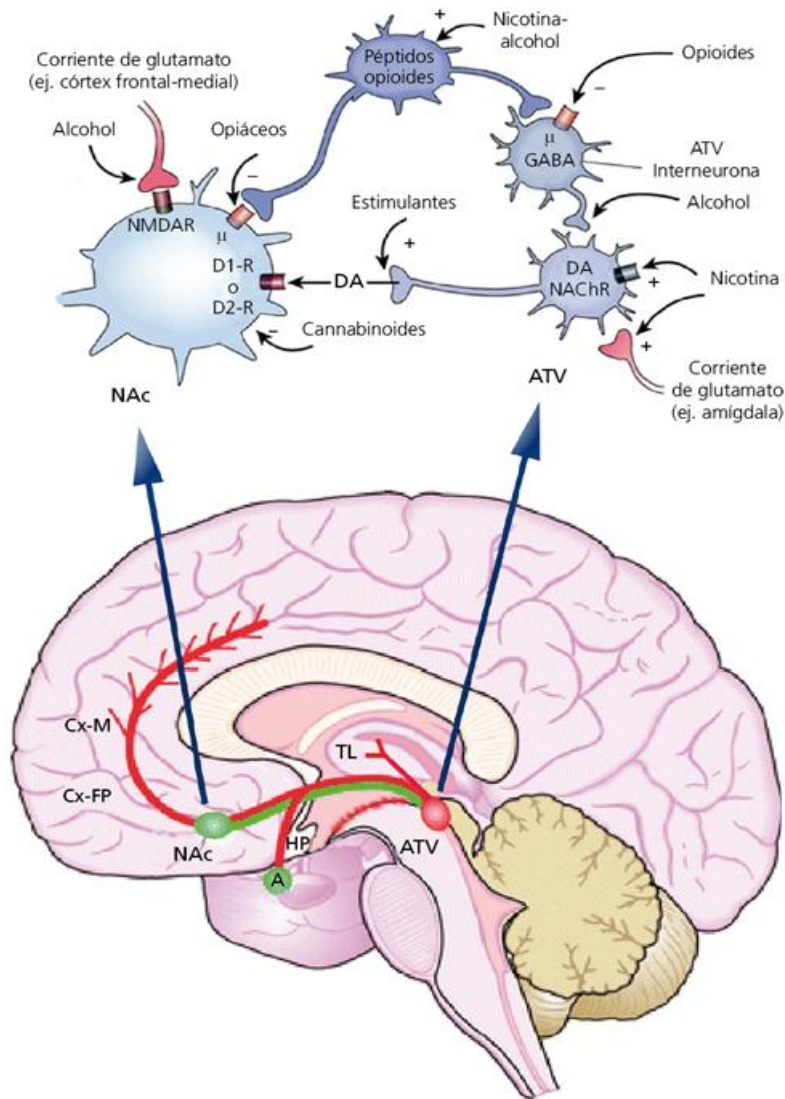
Según la American Society of Addiction Medicine, la *adicción* se define como *una enfermedad crónica y recurrente del cerebro que se caracteriza por una búsqueda patológica de la recompensa y/o alivio a través del uso de una sustancia u otras conductas*. Esto implica una incapacidad de controlar la conducta, dificultad para la abstinencia permanente, deseo imperioso de consumo, disminución del reconocimiento de los problemas significativos causados por la propia conducta y problemas en las relaciones interpersonales así como una respuesta emocional disfuncional (32). Dicha enfermedad se rige por la alteración en los mecanismos de gratificación, que tienen una clara base neurológica sustentada en complejos procesos moleculares. Según el manual diagnóstico DSM-V el trastorno por consumo de alcohol se define como una agrupación de síntomas comportamentales y físicos, entre los que están la abstinencia, la tolerancia y el deseo intenso de consumo.

1.7.1. Drogas y recompensa

Los mecanismos psicológicos y de conducta ligados a la recompensa son claves para la supervivencia. El sistema de recompensa es un circuito cerebral que media el aprendizaje reforzado (el aprendizaje asociado a incentivos y recompensa) y que es el responsable tanto de los afectos positivos de la experiencia (por ejemplo, el consumo de un destilado) como del incremento de la probabilidad de repetir esa conducta. No sólo se aprende las consecuencias de la conducta sino también al asociar ciertas situaciones a una sensación de recompensa (refuerzo secundario). De modo que a partir de estos aprendizajes tenderemos a intentar que en el futuro las situaciones que han generado esa experiencia vuelvan a producirse, iniciando la conducta de búsqueda y consumo del reforzador a partir de la percepción del entorno habitualmente asociado a él. El sistema

de recompensa representa un importante papel en acciones tan básicas como la alimentación, la reproducción y el aprendizaje. El circuito cerebral de la recompensa es muy antiguo filogenéticamente. Las drogas de abuso activan este circuito de forma anormalmente intensa, induciendo el aprendizaje de conductas de consumo de droga y reforzando los estímulos que desencadenan dicho consumo. Tras esta activación anormal, se producen cambios estructurales en el cerebro que dan lugar a alteraciones en los sistemas de recompensa, su búsqueda y activación (33).

La base física del circuito de recompensa son las neuronas que utilizan la dopamina como neurotransmisor (neuronas dopaminérgicas) y las proyecciones de las mismas hacia estructuras telencefálicas que median el aprendizaje asociativo, las emociones y el gobierno de conductas motivadas (sean éstas de naturaleza homeostática como beber agua o no homeostáticas como consumir drogas). Estas neuronas dopaminérgicas se encuentran en la parte profunda del cerebro (área tegmental ventral o ATV) y funcionan en estrecha asociación con otras neuronas que también establecen conexiones con sistemas cerebrales muy importantes para la recompensa, las emociones y el aprendizaje como son las neuronas de noradrenalina y de serotonina. Las estructuras telencefálicas a las que proyectan incluyen a las estructuras de la amígdala ampliada (núcleo *accumbens*, septo, amígdala), la corteza prefrontal medial y el cuerpo estriado (fig. 4.) Particularmente importante es la conexión entre las neuronas del ATV y las del núcleo *accumbens*, estructura que actúa como interfaz para el aprendizaje reforzado, la predicción de recompensas y el aprendizaje de hábitos (34). Las drogas de abuso producen aumentos de dopamina en este núcleo de dos a diez veces superiores a los causados por las recompensas naturales.

Figura 4.**Circuito de recompensa en cerebro y acciones de las diferentes drogas de abuso.**

En esta visión del cerebro (corte anteroposterior por la línea media) se señala la vía dopaminérgica que se extiende desde el área tegmental ventral (ATV) con proyecciones al núcleo accumbens (NAc) y otras áreas del sistema límbico [amígdala (A), corteza prefrontal (Cx-FP), corteza medial (Cx-M), tálamo (TL), hipocampo (HP)]. La parte superior de la figura detalla en forma esquemática algunas acciones de las diferentes drogas sobre componentes de este circuito, y sobre la modulación por los diferentes sistemas de neurotransmisión de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Por ejemplo, los estimulantes, como la cocaína, aumentan la dopamina (DA) en este núcleo al inhibir el transportador de dopamina (DAT), mientras que la nicotina actúa en este circuito interaccionando en el área tegmental ventral con los receptores colinérgicos de tipo nicotínico (NACHR), causando liberación de dopamina en el núcleo accumbens. Los opiáceos causan liberación de DA en este núcleo mediante inhibición de las interneuronas GABAérgicas e interacción con sus receptores μ tanto en el área tegmental ventral como en el núcleo accumbens. El alcohol induce un aumento de DA en el núcleo accumbens, mediante diferentes mecanismos incluyendo la liberación de opiáceos endógenos y su interacción con los receptores μ .

Fuente: Figura modificada de Hyman et al. (17).

Como hemos dicho antes, y se observa en la figura 4, los efectos adictivos de las drogas no corresponden únicamente a la acción de la dopamina, sino que hay multitud de neurotransmisores implicados, aparentemente modulando el sistema dopaminérgico. Por ejemplo, alteraciones en los niveles de glutamato en la corteza cerebral reactivas a la elevación persistente de la dopamina parecen estar en la base del deterioro cognitivo y de la pérdida del autocontrol que puede darse en las adicciones a algunas drogas psicoactivas como la cocaína y el alcohol.

Otra característica de las drogadicciones es su tendencia a persistir como inclinación aún mucho tiempo después de que se haya producido con éxito un proceso de deshabitación. Se ha hipotetizado que esto se debe a la acción coordinada de la amígdala y del estriado dorsal, de modo que el consumo reforzado se transforma en un hábito controlado por el estriado dorsal, que se pone en marcha cuando la amígdala detecta señales sensoriales asociadas al reforzador. Esta sería la base de las recaídas y se ha intentado explicar mediante la inducción de cambios de plasticidad en los circuitos del refuerzo, el fenómeno por el que se establecen nuevas conexiones interneuronales. Así, se ha observado, por ejemplo para la cocaína y el alcohol, un aumento en las espinas dendríticas y en las conexiones interneuronales en el núcleo *accumbens* y la corteza prefrontal (35). Estos cambios se asociarían a la aparición de respuestas asociativas en el estriado y la amígdala, como hemos dicho antes, lo que favorecería la búsqueda y consumo. Dicha remodelación dendrítica parece mantenerse durante largos períodos tras la interrupción del consumo (36).

1.7.2. Mecanismo de la neurotoxicidad del alcohol

Los efectos nocivos derivados del consumo de alcohol han sido ampliamente descritos en multitud de trabajos. Pueden ser directos (provocados por la acción del alcohol en nuestro organismo) o indirectos (provocados por una deficiencia dietética (i.e. Déficit vitamínico de tiamina) asociada al consumo).

Efectos neurotóxicos directos del consumo de alcohol:

El alcohol es una molécula pequeña que puede ejercer su efecto a través de numerosos mecanismos de actuación. Los efectos neurotóxicos directos del alcohol están mediados por varias acciones entre las que destaca su acción sobre los receptores NMDA de las

neuronas glutamatérgicas y la activación de receptores de inmunidad natural, especialmente el TLR4, lo que conduce a neuroinflamación. La ingesta aguda de alcohol resulta en un efecto inhibitorio de los receptores de NMDA, lo que conduce a una regulación al alza del receptor. Cuando la ingesta de alcohol cesa, los receptores regulados al alza dejan de estar inhibidos, lo que resulta en una estimulación excesiva de los receptores de NMDA y causa a su vez un flujo excesivo de calcio que da lugar a efectos citotóxicos (37). Existe una gran concentración de neuronas glutamatérgicas en los lóbulos frontales, en áreas subcorticales y en el hipocampo. Por ello, estas regiones son particularmente vulnerables a los efectos excitotóxicos producidos por la ingesta de alcohol (37).

Además de los efectos mediados por glutamato, El alcohol activa el sistema inmune mediante la estimulación de la señalización glial mediada por los receptores TLR4, promoviendo la liberación de mediadores inflamatorios y causando neuroinflamación directa (38). El alcohol activa la señalización mediada por TLR4 en células gliales, provocando la inducción de moléculas pro-inflamatorias y promoviendo muerte celular (39). La respuesta mediada por el receptor TLR4 constituye un importante mecanismo en la neuroinflamación inducida por alcohol. Recientes estudios preclínicos demuestran que la ausencia de TLR4 protege frente la activación glial inducida por alcohol, reduciendo la inflamación e incluso la ansiedad inducida por el consumo de alcohol (38) (39).

Los síntomas comunes de la neurotoxicidad por alcohol incluyen deterioro cognitivo, pérdidas de memoria y resaca. Con frecuencia el atracón de alcohol causa una intoxicación que puede dar lugar a pérdidas de memoria (40). Una vez que la intoxicación ha pasado, hay una serie de síntomas que pueden persistir durante un tiempo: dolor de cabeza, disforia, temblores, fatiga, vómitos, pérdida de apetito, diarrea y síntomas gastrointestinales.

Las resacas y las pérdidas de memoria ocurren antes de la disfunción cognitiva causada por consumo, por lo que son clínicamente relevantes como factores predictivos del daño cerebral que puede desembocar en el deterioro cognitivo o en disfunción cognitiva permanente (41) (42).

Efectos neurotóxicos indirectos derivados del consumo de alcohol:

Como ejemplo de la neurotoxicidad cerebral indirecta producto del abuso crónico de alcohol, destaca la deficiencia de tiamina, que da lugar al síndrome de Korsakoff. La deficiencia de tiamina causa una liberación excesiva de glutamato que, al igual que el alcohol, provoca un efecto neurotóxico. De hecho, el abuso crónico de alcohol y la deficiencia de tiamina pueden tener un efecto tóxico aditivo o incluso sinérgico (43).

Respecto a la neurotoxicidad del alcohol relacionada con el sistema inmune, el consumo crónico de alcohol altera la concentración de citoquinas en sangre (44). Una de las alteraciones que produce es un aumento del factor de necrosis tumoral alfa o TNF α , que potencia la excitotoxicidad por glutamato y activa la microglia induciendo neuroinflamación (45).

Otros mecanismos que parecen influir en la neurotoxicidad y la disfunción cognitiva provocada por el consumo de alcohol son: toxicidad mediada por radicales libres, toxicidad por acetaldehído, modulación de los receptores de acetil colina, serotonina, dopamina, opioide y ácido gamma-aminobutírico (GABA).

Existen multitud de factores importantes a la hora de analizar la neurotoxicidad del alcohol: patrón de consumo, edad de inicio de consumo, graduación de las bebidas alcohólicas ingeridas, acción conjunta con otras sustancias, patologías psiquiátricas comórbidas, etc. Incluso es posible que estos factores oscilen notablemente en un mismo individuo, ya que el consumo suele extenderse durante largos períodos de tiempo, dando lugar a variaciones en las circunstancias del paciente, por lo que sería necesario tener en cuenta todas estas variables en la medida de lo posible, tanto a la hora de tratar los datos obtenidos en las investigaciones científicas como al abordar el problema desde un punto de vista terapéutico.

En cualquier caso, hay un aspecto común a todas estas variables: todos los mecanismos de acción del alcohol convergen en una acción sobre el sistema nervioso que afecta, entre otras muchas moléculas, a los factores neurotróficos. Por esta fuerte implicación en los procesos neurobiológicos asociados a alcohol, las neurotrofinas son objeto de nuestro estudio y a continuación trataremos de exponer los aspectos más relevantes de estas moléculas.

1.8. Factores de crecimiento

También llamados factores tróficos, son una serie de moléculas, de naturaleza generalmente proteica, que están implicadas en diferentes procesos celulares relacionados con la proliferación, diferenciación, supervivencia y plasticidad neuronal. Se han descrito numerosas familias de estos factores tróficos, pero sólo un número restringido de ellos se ha vinculado a las acciones de las drogas de abuso, y en especial a las del alcohol. A continuación desarrollaremos los principales factores de crecimiento que serán objeto de nuestro estudio.

1.8.1. El factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF)

El factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) pertenece a una familia de proteínas entre las que se incluyen NGF (*nerve growth factor*), neurotrofina 3 y neurotrofina 4. No obstante, BDNF destaca entre todas las demás debido a los elevados niveles de expresión que presenta en el cerebro y su potente efecto a nivel sináptico, que describiremos más adelante. Diversos aspectos relacionados con la biología del BDNF, como su transcripción y secreción, están regulados por la actividad sináptica y viceversa: BDNF modula procesos de plasticidad sináptica y potenciación a largo plazo, ambos fuertemente ligados a capacidades cognitivas como la memoria y el aprendizaje. (46)

El BDNF presenta un papel esencial en la potenciación a largo plazo en el hipocampo y, por tanto, en el aprendizaje. Se ha demostrado que dicha neurotrofina regula la inducción y el mantenimiento de una potenciación a largo plazo estable e induce alteraciones en la liberación de neurotransmisores. Además, modula los receptores de glutamato postsinápticos, regula la síntesis proteica, activa la transcripción y modula la plasticidad estructural de las espinas dendríticas (47).

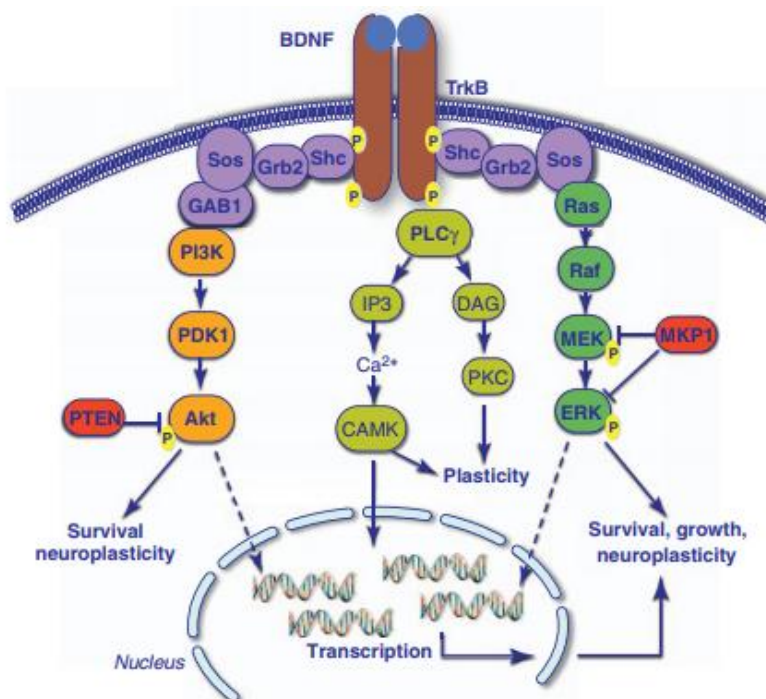
Las respuestas fisiológicas a las neurotrofinas están mediadas por la activación de receptores de membrana del tipo Tropomiosin quinasa (tropomyosin-related kinase, Trk). Nuestra neurotrofina de estudio, BDNF, se une al receptor TrkB (48). Se han detectado receptores de este tipo en los terminales axónicos y en las espinas dendríticas

de neuronas glutamatérgicas hipocampales, tanto a nivel presináptico como postsináptico (49). El dímero ligando-receptor formado por la unión de las neurotrofinas a los receptores TrkB induce la autofosforilación de los residuos de tirosina en el dominio intracelular del receptor, lo que conduce a la activación de diferentes cascadas de fosforilación que desembocan en los distintos efectos fisiológicos (46). Todo ello se explica más detalladamente en la figura 5.

Además de la potenciación a largo plazo, otro importante proceso neuronal mediado por múltiples factores tróficos circulantes en sangre, es la neurogénesis. Entre las moléculas capaces de interferir en la neurogénesis, se encuentran además de BDNF, otros factores como IGF-1 e IGFBP-3, que son también objeto de nuestro estudio. A continuación se muestra la cascada de señalización por la cual el BDNF activa el receptor TrkB, que mediante una serie de fosforilaciones modula la expresión de ciertos genes que regulan los procesos de supervivencia, crecimiento y plasticidad neuronal implicados en la neurogénesis (50).

Figura 5.

Cascada de señalización de BDNF desde la unión a su receptor (TrkB) hasta su acción en la célula.



Extraído de Voleti et al., 2012 (50).

Tanto BDNF como el resto de neurotrofinas son sintetizadas en el retículo endoplásmico, aunque BDNF puede sintetizarse también de forma local en la propia sinapsis, tras el transporte del correspondiente ARN mensajero a través de las dendritas. Al igual que BDNF modula la actividad sináptica, también la expresión del gen *bdnf* y la liberación de la neurotrofina están reguladas por la actividad neuronal, produciéndose una síntesis y liberación de dicha proteína según las condiciones sinápticas que tengan lugar (51).

Teniendo en cuenta la contrastada relevancia de BDNF en los procesos de aprendizaje y memoria, en el contexto de las adicciones y el deterioro cognitivo surge al instante el interrogante de cómo varía la expresión de esta neurotrofina en situaciones de trastorno psiquiátrico y de consumo de alcohol.

Se han detectado alteraciones en las concentraciones de BDNF en diversos trastornos psiquiátricos, especialmente en depresión (52). Además, la presencia de trastornos de depresión está asociada con una disminución de los factores tróficos tanto en modelos clínicos como en preclínicos (52) (53) (54).

Respecto al trastorno por uso de sustancias, BDNF reduce los efectos comportamentales del alcohol y se ha asociado a una disminución en el consumo de alcohol (55). Teniendo en cuenta todos estos datos, uno de los objetivos de este trabajo es ahondar en el conocimiento de los efectos fisiológicos de esta neurotrofina en los diferentes trastornos psiquiátricos, en especial en el trastorno por uso de alcohol.

1.8.2. La Neurotrofina 3 (NT-3)

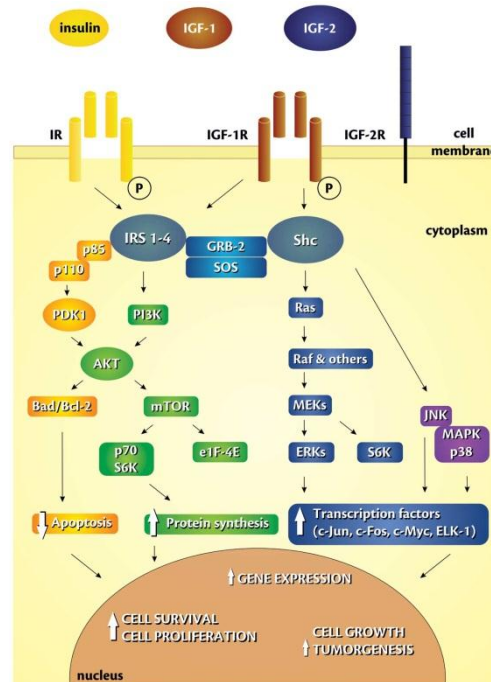
La Neurotrofina 3 (NT-3) es una molécula descubierta hace relativamente poco tiempo, en el instituto Max Planck en el año 1990 (56). Esta neurotrofina se presenta en menor concentración que BDNF y el resto de neurotrofinas, lo que hizo más difícil su identificación. No obstante, NT-3 está presente en diversos órganos del cuerpo, entre ellos el hígado, pero es su importante presencia en el cerebro y en concreto en la región del hipocampo la que explica su relevante papel como factor trófico implicado en el desarrollo neuronal (57), y lo que la ha convertido en objeto de estudio en los últimos años. A nivel molecular, NT-3 presenta una afinidad menos específica por los receptores de neurotrofinas que el resto de las proteínas de su familia, ya que se une con baja afinidad a TrkA, TrkB y al receptor p75 y con una alta afinidad a TrkC (58).

Los factores de crecimiento endógenos han sido ampliamente empleados como agentes neuroprotectores en diferentes modelos de lesión cerebral (59). Como ya hemos visto, las neurotrofinas juegan un papel crucial durante el crecimiento neuronal y la diferenciación, actuando sobre sus receptores Tirosin-Quinasa. La ruta de las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK), desarrollada en la Figura 5, es la principal cascada de señalización de la familia de las neurotrofinas. La aplicación de NT-3 ha demostrado tener propiedades neuroprotectoras en modelos animales de isquemia cerebral (60). Estos precedentes hacen de NT-3 una molécula importante para nuestro estudio, ya que está directamente implicada en procesos neuronales relacionados con el deterioro cognitivo.

Últimamente todos los factores neurotróficos, incluido NT-3, y sus cascadas de señalización se han posicionado como potenciales objetivos de elevada importancia en el desarrollo de la neurotoxicidad por alcohol (61).

1.8.3. Factor de Crecimiento Insulínico tipo 1 (IGF-1)

El factor de crecimiento insulínico tipo I (denominado IGF-1 por sus siglas en inglés, *Insulin-like growth factor-1*) se sintetiza mayoritariamente en el hígado, en especial tras la estimulación de éste por la hormona de crecimiento (G), aunque puede ser producido en cualquier célula del cuerpo humano. IGF-1 circula principalmente unida a las distintas proteínas de unión (IGFBP), siendo la más destacable de todas ellas IGFBP-3, debido a que esta proteína de unión parece presentar también efectos fisiológicos independientes que serán descritos en apartados posteriores. En estados avanzados de enfermedad hepática, las concentraciones en sangre tanto de IGF-1 como de sus proteínas de unión se ven reducidas, (62) lo que nos aporta un dato relevante a la hora de estudiar el IGF-1 relacionado con el trastorno por uso de alcohol, debido a la alta incidencia de enfermedades hepáticas en estos trastornos.

Figura 6.**Cascada de señalización de insulina, IGF-1 e IGF-2**

Cascada de señalización de insulina, IGF-1 e IGF-2. Todos ellos son factores implicados en neurogénesis, crecimiento celular, supervivencia y proliferación. IGF-1 se une principalmente a su receptor y estimula la proliferación o inhibe la apoptosis a través de distintas cascadas de señalización. IGF-1R es un receptor tirosinquinasa que cataliza la fosforilación de diversas proteínas. Las más significativas son AKT y ERK, proteínas de señalización implicadas en los procesos de apoptosis, y expresión génica

Extraído de Kasprzak et al., 2011, *The insulin-like growth factor (IGF) signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (Review)*.

Entre sus muchas funciones, IGF-1 ha mostrado ser citoprotector (63) y los cambios en la señalización de este péptido parecen estar implicados en la patogénesis de diferentes trastornos psiquiátricos, entre los que se incluyen ansiedad y depresión (64) (65). En modelos clínicos, se ha encontrado una relación entre IGF-1 y la consolidación de recuerdos relacionados con la activación del sistema de recompensa en situaciones de “*craving*” por alcohol y dependencia a opiáceos (66) (67).

Un aspecto importante de IGF-1 y que comparte con otros factores de crecimiento como IGFBP-3 y BDNF, es que son factores circulantes en plasma, lo que facilita su evaluación y medición, capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, ejerciendo en el cerebro su función (68).

1.8.4. La Proteína de Unión a IGF 3. (IGFBP-3)

Las IGFBP son proteínas de unión de las IGF (denominadas así por sus siglas en inglés, *IGF binding protein*). Hasta la fecha, se han identificado 7 tipos de IGFBP. Una de las funciones principales de las IGFBP es la modulación de la bioactividad de las distintas IGFs. Presentan además otras funciones, entre las que destacan el aumento de la vida media de las IGFs en sangre, su almacenamiento en compartimentos tisulares y la inhibición de su actividad al disminuir la accesibilidad a los receptores. Además, la evidencia científica actual apunta a que son capaces de actuar también independientemente de las IGF, induciendo mitogénesis y migración celular. También interaccionan con otros factores de crecimiento implicados en proliferación celular como el TGF- β . La más común de esta familia de proteínas de unión es IGFBP-3, ya que une el 90% de las IGFs (69).

Se ha demostrado que IGFBP-3 es una proteína de unión capaz de prolongar la vida media de IGF-1 en humanos. Además, en relación con los efectos nocivos del alcohol, IGFBP-3 podría estar implicado en la duración de la abstinencia alcohólica (70).

Como ya mencionamos en el apartado anterior, aunque IGF-1 circula principalmente unida a las distintas proteínas de unión (IGFBP), la más destacable de toda esta familia de proteínas es IGFBP-3, debido a que esta proteína de unión parece presentar también efectos fisiológicos independientes a IGF-1, tales como la contribución a mediar la proliferación, muerte y supervivencia celular (71). Hay evidencias de que, en edades avanzadas, concentraciones menores de IGFBP-3 están asociadas a mayores cifras de mortalidad (72). También hay estudios que muestran una sobreexpresión de IGFBP-3 en cerebros postmortem de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Alzheimer (73).

Por todo esto, en la actualidad existe un interés creciente por conocer los efectos de esta proteína a nivel de sistema nervioso central y su posible relación con la demencia. Recientemente, estudios tanto longitudinales como transversales, apuntan a que la concentración de IGFBP-3 es menor entre las personas de edad avanzada con deterioro cognitivo y está inversamente asociada con demencia. Se ha observado que aquellos pacientes que duplicaban la media de concentración de IGFBP-3 presentaban una incidencia de demencia un 25% menor, mientras que los hombres en el quintil inferior

de concentración de IGFBP-3 en plasma presentaban, de media, un 40% más de riesgo de desarrollar demencia en los nueve años próximos que el quintil más alto (74).

1.9. El Sistema endocannabinoide

Uno de los sistemas homeostáticos que se ven afectados por el consumo de alcohol es el denominado sistema endocannabinoide. Este sistema fisiológico, que describiremos más adelante, regula múltiples funciones fisiológicas y el consumo de alcohol lo desregula de modo semipermanente. El interés que tiene este sistema es doble: no sólo media en las acciones del alcohol, sino también en las del Δ^9 -tetrahidrocannabinol, el principal componente psicoactivo del cannabis (75). El cannabis es la droga ilegal cuyo consumo comórbido con alcohol se presenta con mayor frecuencia en adolescentes y adultos jóvenes, por lo que el estudio de los componentes del sistema cannabinoide y del THC tiene una gran importancia. Como tanto el THC como algunos componentes del sistema endocannabinoide (en especial la oleoiletanolamida) regulan la neurogénesis y la inflamación (76) (77), en la presente tesis se plantea el estudio de la interacción de estas moléculas con el BDNF y los procesos de plasticidad y neurogénesis.

El sistema endocannabinoide (SEC) es un sistema neuromodulador ampliamente extendido en el organismo y que tiene una fuerte presencia en diferentes procesos biológicos relacionados, entre otras cosas, con la cognición. Algunos de esos procesos son: el desarrollo del sistema nervioso central, la plasticidad sináptica y la mediación en la respuesta ante alteraciones fisiológicas tanto endógenas como ambientales (78). El SEC se compone de los receptores cannabinoides, los cannabinoides endógenos (o endocannabinoides) y las enzimas responsables de la síntesis y degradación de los endocannabinoides. El receptor cannabinoide más abundante es el CB1. No obstante, existen otros receptores como CB2, los receptores de potencial transitorio (denominados TRP por sus siglas en inglés, transient receptor potential) y los receptores PPAR (Receptor de Peroxisoma Proliferador Activado) que también pueden activarse por la acción de determinados cannabinoides (79) y que veremos a fondo más adelante. Los efectos de los endocannabinoides están fundamentalmente mediados por los receptores CB1 y CB2, mientras que los receptores TRP y PPAR median algunas de las acciones de los endocannabinoides, principalmente de las aciletanolamidas (80) familia a la que

pertenece la OEA (Oleiletanolamida). Los cannabinoides endógenos más estudiados son 2-araquidinoil glicerol (2-AG) y araquidinoiletanolamida, más conocido como anandamida. A pesar de las similitudes en su estructura química, 2-AG y anandamida se sintetizan y degradan mediante distintas rutas enzimáticas, lo que provoca que posean roles fisiológicos muy diferentes (81). Los cannabinoides exógenos, como el THC producen sus efectos biológicos a través de su interacción con los receptores cannabinoides.

Los receptores CB1 se expresan muy abundantemente en el sistema nervioso central, especialmente en la corteza, los ganglios basales, el hipocampo y el cerebelo. Debido a esta gran presencia a nivel cerebral del sistema endocannabinoide, su estudio a nivel cognitivo está cobrando cada vez mayor importancia (82).

1.9.1. Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (THC)

A la hora de analizar las consecuencias del consumo de alcohol, es importante tener en cuenta otras variables asociadas a esta patología, como el consumo concomitante de otras sustancias. En el presente trabajo, analizamos el impacto que tiene el THC (Δ^9 -tetrahidrocannabinol) sobre el sistema nervioso, ya que dicha molécula es el principal componente psicoactivo del cannabis, la droga ilegal más consumida (2). El THC actúa principalmente como agonista del receptor cannabinoide CB1, que como hemos visto en el apartado anterior, tienen una fuerte presencia en el cerebro. Por ello, del consumo de THC se derivan efectos sobre el desarrollo y el funcionamiento del cerebro, así como déficits en la memoria a corto plazo (83). En nuestros estudios nos centramos en el hipocampo, un área cerebral en el que coinciden muchos de los objetivos de la presente tesis, ya que está muy relacionada con los procesos de memoria, el alcohol ejerce un gran efecto sobre ella y además contiene una enorme densidad de receptores CB1 (84).

El impacto del THC sobre el cerebro es indudable, y a continuación se citan diferentes trabajos en los que se desarrollan los efectos que tiene su consumo sobre el sistema nervioso central. No obstante, no existe un consenso sobre las consecuencias que derivan del consumo de THC y existen cientos de artículos que defienden posturas opuestas. Por citar algunos, en los estudios de Bilkei-Gorzo (85) y Nguyen (86) se aporta evidencia de que el consumo de THC restaura la función cognitiva en ratones y que el consumo de THC tiene una función neuroprotectora. Por otro lado, Ford (87) y

Mizrahi (88) exponen los efectos nocivos del consumo de THC sobre el sistema nervioso central. En este trabajo realizado por Calabrese en el año 2018 (89) se desarrolla el concepto de que los efectos del THC pueden variar en función del estado basal de la persona y principalmente de la dosis, por lo que habrá que tener en cuenta el máximo número de variables posibles a la hora de evaluar los efectos que produce la acción del THC a nivel cerebral.

En la presente Tesis, se analiza el impacto de la administración de dicha sustancia a nivel conductual y sobre el hipocampo de las ratas expuestas a consumo de alcohol en atracón.

1.9.2. Oleiletanolamida (OEA)

La OEA, agonista endógeno del receptor PPAR α , pertenece a la familia de las *N*-aciletanolamidas y es un análogo monoinsaturado de la anandamida (90), endocannabinoide descrito anteriormente. No obstante, a diferencia de la anandamida, la OEA no actúa sobre los receptores cannabinoideos sino como agonista del receptor PPAR α . En pocas palabras, podríamos decir que la OEA es un endocannabinoide sin afinidad por los receptores cannabinoideos, sino por el receptor PPAR α (91). Los receptores PPAR presentan tres isoformas: alfa, beta y gamma. La acción de la OEA se centra principalmente en la isoforma alfa del receptor PPAR. Una de las funciones más importantes que median estos receptores es la regulación de la expresión génica (92). Además de sus efectos en el núcleo celular, PPAR también está implicado en procesos extranucleares relacionados con las proteínas quinasas (93) y en la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Los receptores PPAR se expresan en diferentes tejidos del organismo, presentando una alta presencia en el cerebro, por lo que han sido relacionados con procesos cognitivos. Además, los agonistas de los receptores PPAR han sido empleados en tratamientos para desórdenes metabólicos (94).

La OEA, compuesto objeto de nuestro estudio, se sintetiza, entre otros lugares, en el intestino delgado y está relacionada con la regulación del apetito y la lipólisis. No obstante, debido a la elevada presencia de receptores PPAR en el cerebro, también presenta una función neurotransmisora que participa en procesos cognitivos y de regulación del sistema de recompensa (95) (96).

La OEA ha mostrado ser capaz de contrarrestar el efecto neuroinflamatorio provocado por el alcohol (97) y disminuir el comportamiento de búsqueda de la sustancia o “craving” (98).

Recientes estudios preclínicos señalan la implicación de la OEA en los mecanismos homeostáticos de protección como respuesta al uso nocivo de alcohol (98). Un estudio publicado por nuestro grupo durante el pasado año mostró que las concentraciones plasmáticas de OEA permanecen elevadas en pacientes con trastorno por uso de alcohol, lo que indica que la OEA podría actuar como potencial biomarcador de la duración de la abstinencia alcohólica (99). Pese al claro potencial clínico de la OEA para el tratamiento del trastorno por uso de alcohol, en el desarrollo de esta Tesis solo se exponen investigaciones acerca de este lípido neurotransmisor a nivel preclínico. Estudios previos han demostrado que, tras el consumo de alcohol en roedores se produce una liberación de OEA. Además, su administración exógena regula las recaídas y reduce varios síntomas de la abstinencia (97) (98). El perfil neuroprotector y antiinflamatorio de la OEA no se limita al daño provocado por el consumo de alcohol; diferentes estudios apuntan a sus propiedades frente a diferentes modelos animales de daño neurológico, como pueden ser Parkinson y Alzheimer (100) (101).

2.Hipótesis y objetivos

La adicción al alcohol y el deterioro cognitivo son dos enfermedades crónicas estrechamente relacionadas. Como ya se ha desarrollado en la introducción, en numerosas ocasiones el consumo causa o adelanta la aparición del TNC. Además, ambas conllevan alteraciones neurobiológicas que a su vez presentan también puntos comunes, como el impacto sobre los procesos neurogénicos y los factores tróficos. El presente trabajo está orientado a caracterizar el deterioro cognitivo causado por consumo de alcohol a través de las alteraciones a nivel fisiológico, con la finalidad última de aportar avances en la terapéutica de este proceso. Para llevar a cabo dicha tarea se fijaron los siguientes objetivos e hipótesis.

2.1. Hipótesis

- I. En pacientes alcohólicos que demandan tratamiento ambulatorio por un problema de alcoholismo existe una prevalencia elevada de deterioro cognitivo asociado al consumo.
- II. En pacientes alcohólicos que demandan tratamiento ambulatorio por un problema de alcoholismo, los niveles plasmáticos de distintos factores de crecimiento están alterados.
- III. Las alteraciones plasmáticas de estos factores de crecimiento, y en especial la disminución de BDNF, están relacionadas con la gravedad del deterioro cognitivo y de la dependencia alcohólica, por lo que actúan como biomarcadores de estas patologías.
- IV. A partir de modelos animales que reproduzcan las condiciones de consumo de alcohol de los humanos, detectaremos alteraciones de los mecanismos moleculares de señalización cerebral de estos factores de crecimiento y su repercusión sobre la neurogénesis en el hipocampo.
- V. En un modelo animal preclínico de consumo en atracón, las acciones del alcohol se ven influidas por la administración de THC y son total o parcialmente contrarrestadas por la administración de OEA

2.2. Objetivos

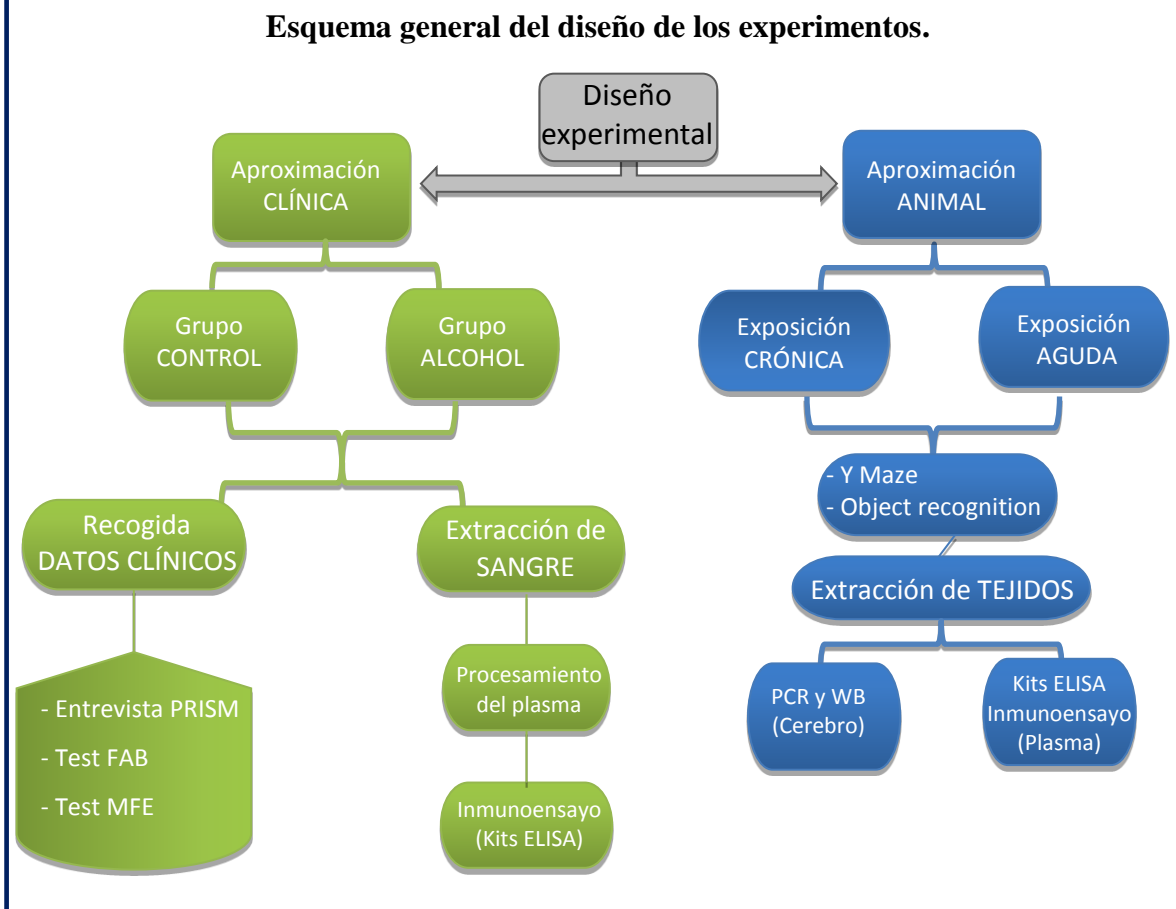
- I. Partiendo de una población de pacientes en tratamiento por TUA, analizar la prevalencia de TNC leve y TNC mayor mediante evaluaciones neuropsicológicas de cribado. Se comparará con una población control de referencia.
- II. Obtener información clínica y biológica (muestra de plasma) de estos pacientes y de sus controles poblacionales, a partir de la cual realizaremos las mediciones de factores neurotróficos (BDNF, IGF-1, IGFBP-3). Se realizará un análisis estadístico orientado de regresión logística destinado a confirmar o refutar las tres primeras hipótesis.
- III. Desarrollo de un modelo animal que reproduzca las condiciones del consumo crónico de alcohol en humanos con el fin de analizar en profundidad los procesos biológicos y comportamentales que tienen lugar durante la exposición alcohólica.
- IV. Determinación de factores neurotróficos en plasma. Determinación de la expresión génica y proteica de de estos factores y de sus sistemas de señalización en regiones concretas del cerebro de estos animales (especialmente en el hipocampo).
- V. Análisis a nivel molecular y tisular del impacto producido en el hipocampo de los animales por la administración de alcohol siguiendo un patrón de “atracción”. Análisis de la co-administración de alcohol y del principal componente psicoactivo del cannabis el THC.
- VI. Análisis de la potencial reversión de las acciones del alcohol consumido en atracción, sólo o en combinación con THC, por la administración de la acetilcolina OEA.
- VII. Ampliar el conocimiento actual sobre el papel de los factores tróficos en los procesos neurogénicos relacionados con el consumo, la memoria y el aprendizaje y aportar avances relevantes que puedan contribuir a la elaboración de estrategias terapéuticas eficaces en el tratamiento de los problemas de trastorno por uso de alcohol y deterioro cognitivo.

3. Metodología

3.1. Diseño general de los experimentos

El marco metodológico de esta tesis se basa en el estudio descriptivo, exploratorio y transversal de una población de pacientes que acuden a tratamiento ambulatorio en un centro asistencial hospitalario por su diagnóstico de trastornos por uso de alcohol. Los pacientes son de ambos sexos y se estudian en abstinencia mantenida. La exploración y caracterización de esta población se llevó a cabo mediante su comparación con una muestra de sujetos pertenecientes al grupo control (sin trastornos por uso de sustancias) reclutados entre el personal sanitario de las instituciones participantes. Todos los datos clínicos de los estudios realizados con estas dos poblaciones (alcohol y control) se recogen a partir de entrevistas de evaluación psiquiátrica y pruebas de evaluación neuropsicológica. Los datos fisiológicos se obtienen a través de la determinación plasmática de potenciales marcadores biológicos que están relacionados con los TUA y el deterioro cognitivo.

Partiendo de esta base, se desarrollan dos modelos animales que reproduzcan las condiciones de consumo humano para explorar más en profundidad las consecuencias de la ingesta de alcohol en el organismo a nivel de cognición, factores de crecimiento y sistema nervioso central. El diseño general de los experimentos se encuentra detallado en la figura 7.

Figura 7.

3.2. Estudio clínico

3.2.1. Aspectos éticos de los estudios clínicos

Todos los participantes fueron informados mediante una descripción completa de los estudios antes de la realización de la entrevista clínica y de la extracción de la sangre. Los pacientes, eran informados por los sanitarios del programa de deshabituación de alcohol, y de esta forma se firmaba el consentimiento informado una vez que el paciente decidía participar. De forma similar, se informaba a los participantes del grupo control, que fueron reclutados de forma aleatoria entre el personal del Hospital Regional Universitario de Málaga, Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y personal de la Universidad Complutense de Madrid.

Los aspectos éticos del presente estudio fueron aprobados por el comité de ética en Investigación Clínica del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. El protocolo

de reclutamiento fue aprobado por el comité ético del Hospital Regional Universitario de Málaga de acuerdo con los principios éticos de investigación en humanos aprobados en la Declaración de Helsinki por la Asociación Médica Mundial. Este estudio está enmarcado en el programa “Consecuencias médicas del alcoholismo” perteneciente a la Red de Trastornos Adictivos del Instituto de Salud Carlos III”.

3.2.2. Descripción de la población de estudio

La población participante en este trabajo estaba formada por sujetos de ambos sexos, de raza blanca caucásica, distribuidos en dos grupos en función de la existencia de un historial de TUA: 1) Pacientes en abstinencia de alcohol procedentes del área de psiquiatría del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid y de los centros provinciales de drogodependencias de la provincia de Málaga; 2) Grupo control de sujetos compuesto por voluntarios pertenecientes en su mayoría al personal asistencial de los centros hospitalarios participantes, y sin historial de trastornos por uso de alcohol u otras sustancias. Los controles fueron seleccionados para obtener una población equilibrada en cuanto a la edad, nivel educativo, índice de masa corporal (IMC) y ratio de sexo del grupo alcohol.

3.2.3. Criterios de participación

El reclutamiento de la población para los estudios que componen esta tesis se basó en el cumplimiento de unos criterios de participación. Los participantes eran mayores de edad, con una edad comprendida entre 18 a 65 años, y habían accedido a participar de forma voluntaria y anónima a través de la firma de los consentimientos informados pertinentes. A continuación, se especifican los criterios de inclusión específicos de cada grupo de participación:

3.2.4. Criterios de inclusión del grupo alcohol

Los participantes incluidos en el grupo alcohol debían haber sido diagnosticados por un TUA (abuso y/o dependencia) y se encontraban en tratamiento ambulatorio en un programa de deshabitación guiada y participación en terapias grupales psicoeducativas. La sustancia principal por la que habían acudido a tratamiento debía haber sido el alcohol, a pesar de que podía haber otras sustancias de consumo o problemática

asociada. El diagnóstico de TUA fue determinado mediante una entrevista personal de evaluación psiquiátrica individualizada basada en criterios DSM-IV-TR y corroborados por el historial médico del paciente.

Los pacientes debían estar en abstinencia al menos 4 semanas previas a la extracción de muestra biológica. La monitorización de la abstinencia se realizaba en enfermería las primeras semanas con la toma ambulatoria de la medicación en presencia de los sanitarios, y a través de un alcoholímetro antes de realizar la analítica para comprobar que el contenido de alcohol en el aire espirado fuese 0 g/L en el momento de la extracción.

3.2.5. Criterios de inclusión del grupo control

Los criterios de inclusión que se tuvieron en cuenta para la participación de los sujetos controles fueron los siguientes: no haber tenido diagnóstico de trastornos por uso de sustancias a lo largo de su vida ni historial de comorbilidad psiquiátrica concomitante. Se trató en todo momento de seleccionar sujetos comparables en edad, IMC, nivel educativo y sexo con el grupo de participantes casos.

3.2.6. Criterios de exclusión para ambos grupos

Los criterios de exclusión que se tuvieron en cuenta para la participación en los distintos estudios para ambos grupos fueron los siguientes:

- La ausencia de enfermedades infecciosas. Este criterio se comprobó a través de pruebas de rápida detección en plasma para VIH, hepatitis B y C. En cada caso positivo, la muestra de sangre se elimina siguiendo un protocolo de seguridad de laboratorio para minimizar los riesgos de infección del personal sanitario e investigador.
- El rechazo de participación por parte del paciente o del control. En el caso de participantes mujeres, se excluyen en el estudio mujeres embarazadas, para evitar la alteración de parámetros biológicos.

3.2.7. Evaluación clínica

En los estudios clínicos se realizó la evaluación minuciosa de cada paciente de estudio mediante herramientas de evaluación clínica, realizada por un psicólogo sanitario general con formación especializada y acreditada en evaluación psicopatológica, con el fin de detectar posibles patologías psiquiátricas adicionales al trastorno por uso de

sustancias. Se realizó el mismo procedimiento de evaluación para el grupo control, pero la entrevista se llevó a cabo en un formato de cribado diagnóstico.

Todos los participantes del estudio fueron evaluados de acuerdo a criterios DSM-IV-TR, mediante la utilización como instrumento principal de la versión española de la *Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases* (PRISM) (102) (103) Este instrumento es una entrevista semiestructurada, con cualidades psicométricas en términos de fiabilidad test-re-test (102), fiabilidad entre distintos evaluadores (104) y validez (103) para el diagnóstico de trastornos psiquiátricos en consumidores de sustancias de abuso que permite diferenciar los trastornos mentales primarios de los trastornos inducidos por sustancias y de los efectos esperados de la intoxicación y de la abstinencia. Aunque poco antes del inicio de la presente Tesis Doctoral surgió un nuevo acuerdo diagnóstico de las enfermedades mentales (DSM-V), el instrumento PRISM no se había adaptado y validado a esta clasificación por lo que todos los estudios se publicaron adheridos al manual DSM-IV-TR.

3.2.8. Evaluación neuropsicológica

A la hora de seleccionar qué pruebas eran las más adecuadas para valorar el estado cognitivo de los pacientes, tuvimos en cuenta los factores siguientes:

- Debían ser pruebas validadas y de probada eficacia, para que de su aplicación se pudiera obtener datos válidos y fiables.
- Las pruebas seleccionadas englobarían las áreas cognitivas más afectadas en los trastornos por uso de alcohol, como lo son la función ejecutiva y la memoria.
- La evaluación debía de ser rápida y sencilla con el fin de evitar el cansancio y la incomodidad en el paciente ya que, si estas evaluaciones eran excesivamente complejas o largas, sumadas a la extracción de sangre y a la entrevista PRISM, podían llegar a ser tediosas para el paciente.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, nos decantamos por las versiones españolas de las siguientes pruebas: Frontal Assessment Battery para la función ejecutiva, Memory Failure 30 Test para evaluar la memoria y el test de Stroop para interferencia y velocidad de procesamiento. Consideramos que el conjunto de estas tres pruebas cubría a la perfección todas las necesidades referidas.

- Frontal Assessment Battery (FAB) (Ver Anexo 1)

Para la evaluación de la función ejecutiva, se empleó el test FAB, que ha demostrado ser una herramienta válida y fiable para el cribado de deterioro de la función ejecutiva. El test consta de seis ítems, puntuables de 0 a 3, siendo 0 la menor puntuación y 3 la máxima. Con lo cual, la mejor calificación a la que puede optar cualquier persona que se someta a la prueba es de 18 puntos. El punto de corte para el déficit frontosubcortical se ubicó en 16-15 y el punto de corte para la demencia frontosubcortical en 13-12. A la hora de realizar los grupos estadísticos, un paciente con una puntuación de 15 se incluirá en el grupo de déficit frontosubcortical mientras que un paciente con un baremo de 12 formará parte del grupo de demencia frontosubcortical (105).

Tabla 2.

Distribución de la población examinada según la puntuación del test FAB.

| Grupo | Normalidad | | | Déficit | | | Demencia frontosubcortical | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|----|----|---------|----|----|----------------------------|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| Puntuación | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

En el anexo 1 se muestra una copia del test empleado en el la evaluación de los pacientes con TUA.

Tabla creada a partir de los baremos establecidos por (Rodríguez del Álamo et al., 2003)

- Memory Failure Everyday 30 test (MFE30) (Ver Anexo 2)

El Memory Failure Everyday 30 test es un autotest de treinta afirmaciones diseñado para arrojar información sobre el estado memorístico de una persona. El paciente, en este caso ayudado por un evaluador cualificado, ha de calificar de 0 a 5 cuan identificado se siente con cada una de las afirmaciones, siendo 0 el mínimo y 5 el máximo. Dado que todas las afirmaciones son sobre olvidos cotidianos, cuanto más identificado se sienta el paciente con las afirmaciones, mayor será la puntuación y mayor será su deterioro. Los baremos aportados por diferentes estudios muestran que el MFE-30 es un instrumento útil en la práctica clínica apuntando que existe una estrecha relación entre la aparición de quejas cognitivas, la presencia de sintomatología

prefrontal y el estrés percibido (106). Por su eficacia y su rápida y sencilla aplicación, este fue nuestro test de referencia para evaluar la existencia de afectación de memoria en la cohorte de estudio. Para la interpretación clínica de los resultados se siguió el “baremo para la interpretación clínica” incluido en el anexo 2.

3.2.9. Obtención y procesamiento de la sangre en

humanos

Las muestras de sangre de cada paciente se recogieron por la mañana a primera hora (de 8:30 a 11:00h) por el equipo de enfermería, tras un periodo de ayuno de 8 a 12 horas y previa prueba de alcoholímetro, el día de la entrevista psiquiátrica u otro diferente, según los horarios de los pacientes. A partir de estas muestras se determinaron las concentraciones de diferentes moléculas circulantes.

La sangre periférica fue extraída y transportada en tres tubos de 10 mL con K2 EDTA (BD, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). Las muestras de sangre fueron inmediatamente procesadas para la obtención del plasma a través de su centrifugación a 2200 xg durante 15 minutos (4°C).

Las muestras plasmáticas válidas fueron fraccionadas en varios criotubos perfectamente codificados y se almacenaron a -80°C hasta sus posteriores análisis. Uno de los tubos de sangre individual de cada paciente perteneciente al grupo alcohol se enviaba el día de la extracción al Biobanco de la Red de Trastornos Adictivos. Junto a la muestra se enviaba un registro de datos sociodemográficos, tiempo de abstinencia, la exploración de trastornos mentales y de sustancias necesarias para rellenar el registro en su base de datos. Este envío se realizaba de manera urgente desde el hospital y lo recibían en Alicante a primera hora de la mañana para su correcto almacenamiento.

Estas muestras están siendo analizadas en la actualidad para identificar polimorfismos genéticos en los genes candidatos responsables de la producción y función de los biomarcadores seleccionados, y constituyen una de las investigaciones derivadas de esta Tesis Doctoral.

4.3 Diseño de los estudios preclínicos en animales

3.3.1. Aspectos éticos del estudio preclínico

Los experimentos y procedimientos se llevaron a cabo bajo una estricta adherencia a la Directiva Europea 2010/63/EU9 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos y de la normativa española (RD 53/2013 y 178/2004). Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento innecesario y reducir el número de animales utilizados. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

3.3.2. Consideraciones generales

Para la valoración traslacional de las acciones del alcohol sobre alguno de los biomarcadores seleccionados en los estudios humanos, se llevaron a cabo distintos estudios con ratas Wistar macho (Laboratorio Charles River España S.A., Barcelona, España) con un peso de 175-225 g en el día post-natal 21, que marcó el comienzo de los experimentos. La exposición a alcohol se realizó en un modelo de administración crónica y otro modelo de administración aguda, según los protocolos descritos para cada estudio.

Las ratas se mantuvieron en jaulas transparentes, bajo un ciclo de 12 h de luz/oscuridad (luces apagadas a las 20:00h) en una habitación con una temperatura ambiente de 23° y 55% de humedad en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga (España) para el modelo de exposición repetida de alcohol en atracón (Binge) mediante administración intragástrica. Por otro lado el modelo de exposición continuada de alcohol mediante administración oral por libre elección (bottle choice) se realizó, en idénticas condiciones ambientales, en el animalario de la Facultad de Psicología de la Universidad Complutense de Madrid. El agua y el pienso estaban disponibles *ad libitum* durante todo el curso de los experimentos.

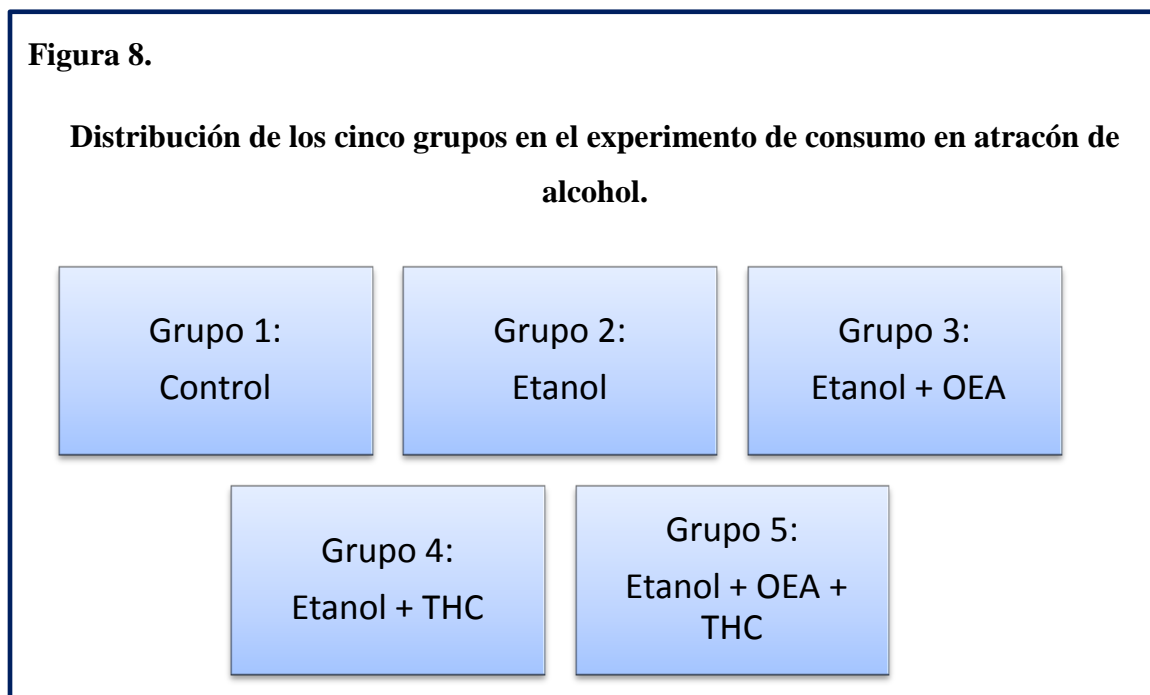
3.3.3. Procedimiento experimental de la exposición a alcohol en modelos animales.

Con el fin de modelizar los tratamientos de atracón y libre elección, se realizaron sendos experimentos animales con consumo de etanol. En ambos modelos las ratas se acostumbraron a las condiciones experimentales, incluyendo la manipulación y el

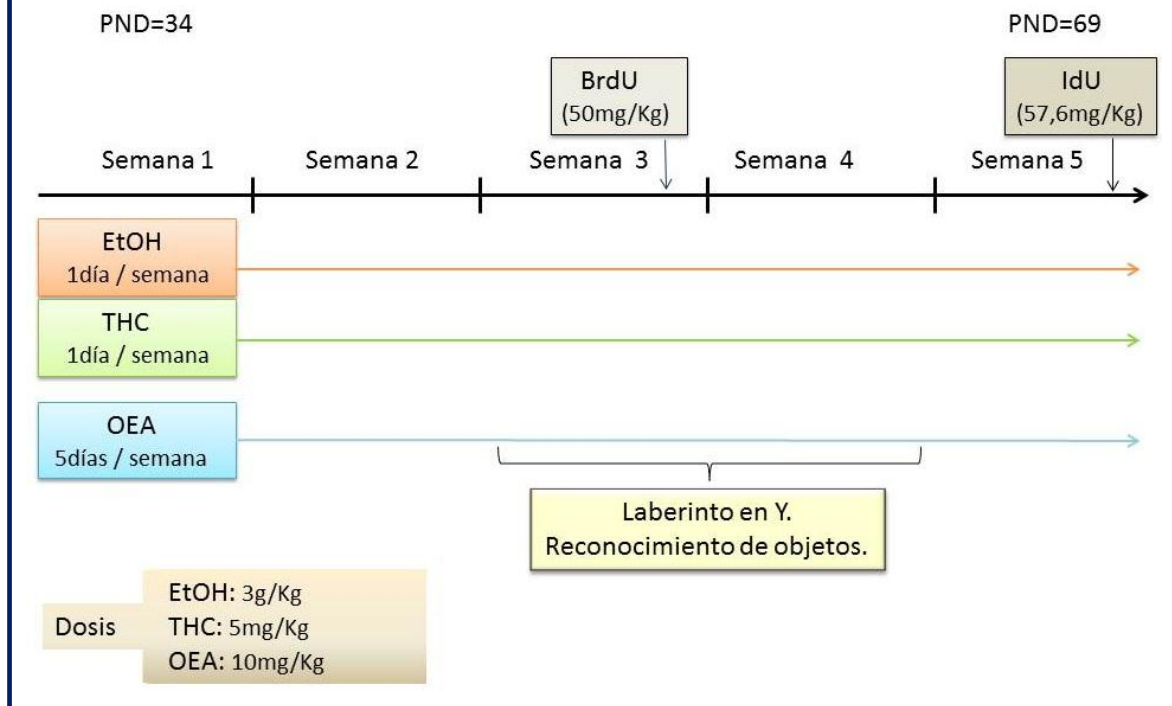
procedimiento de alimentación forzada intragástrica durante un periodo de una semana, usando una solución salina. Cada grupo experimental estaba compuesto por 8 ratas.

3.3.3.1. Exposición repetida a etanol tipo atracón.

Se dividió la N total (N=40) en 5 grupos de 8 animales, de la siguiente manera:



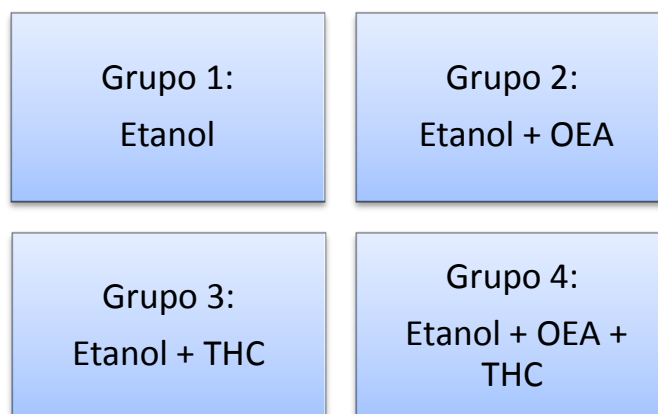
La administración de etanol a los grupos correspondientes se realizó a través de una sonda intragástrica mediante la que se inyectó una solución de etanol (3 g/kg en solución salina). En el caso del grupo control, se procedió de igual manera, pero el contenido de dicha administración fue la solución salina empleada como vehículo con el fin de que los factores propios de la técnica (estrés generado, pequeñas heridas esofágicas, etc) no influyeran en los resultados. Esta ingesta forzada de alcohol se realizó un día a la semana (viernes) durante 5 semanas, tratando de reproducir un patrón de consumo en atracón durante los fines de semana (tipo *Binge*), habitual en ciertos sectores de la población, especialmente en los jóvenes. Además, se administraron dosis de OEA y THC como se describe a continuación en el diagrama.

Figura 9.**Diseño experimental: Exposición repetida a etanol tipo atracón.**

Todas las ratas se sacrificaron por decapitación una semana después de la última sesión de etanol o solución salina intragástrica. Previo al sacrificio se administró al animal un anestésico, tal y como se describe en los artículos de la sección de resultados. Se recogieron muestras de sangre y se extrajo el hipocampo para su posterior análisis.

3.3.3.2. Exposición continuada a alcohol por libre elección (*Bottle choice*)

Simultáneamente, se realizó el experimento de exposición continuada al alcohol en un grupo diferente de ratas (N=44). Se dividieron en 4 grupos de 11 animales, empleándose como control puro el grupo control del experimento anterior, ya que se produjo en idénticas condiciones.

Figura 10.**Distribución de los cuatro grupos en el experimento de exposición continuada al alcohol (Bottle choice).**

Nota: En la presente Tesis Doctoral no se incluyen los datos derivados del estudio de los grupos 2,3 y 4, que serán desarrollados en futuras publicaciones, estableciendo comparaciones con el modelo de consumo en atracción.

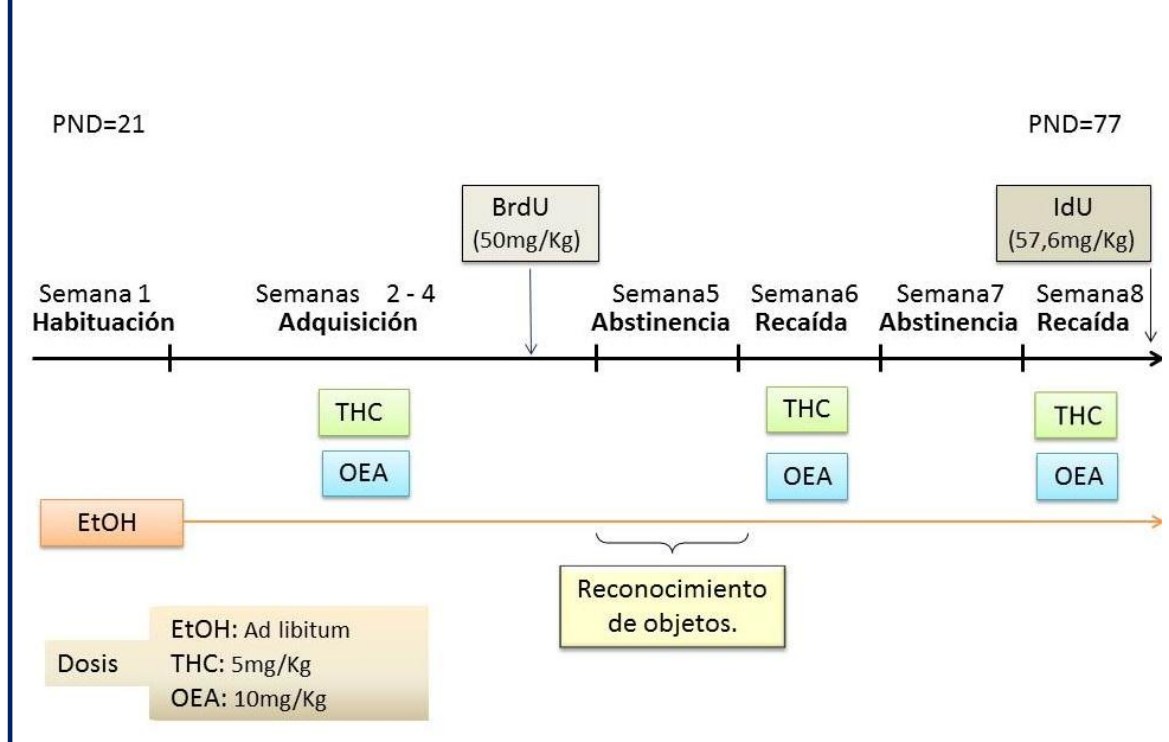
En este experimento, los animales presentaban tres botellas con distintas concentraciones de alcohol, al 5%, al 10% y al 20%, simulando las distintas graduaciones a las que se tiene acceso en el consumo humano. Además, en todo momento tuvieron una cuarta botella que contenía agua.

En este caso, los animales elegían libremente cuándo consumir el alcohol, de qué graduación y en qué cantidades. Diariamente, se pesaba la botella y, en función de la graduación y teniendo en cuenta la densidad del alcohol, se calculaban los gramos de alcohol puro ingeridos por el animal.

Durante las semanas 5 y 7, se les retiró el alcohol para provocar una fase de abstinencia, seguida de una fase de recaída que tuvo lugar en las semanas 6 y 8. En el siguiente diagrama se explica el procedimiento de forma esquemática:

Figura 11.

**Diseño experimental: Exposición continuada a alcohol por libre elección
(Bottle choice)**



Todas las ratas se sacrificaron por decapitación tras terminar la semana de la segunda recaída. Se recogieron muestras de sangre de cada grupo. Para la obtención de plasma, la sangre se centrifugó (2.000xg durante 15 minutos) y el plasma se mantuvo a -80°C para su posterior análisis.

3.3.4. Pruebas de comportamiento en modelo animal

3.3.4.1 Laberinto en Y

El laberinto presenta tres brazos interconectados por un espacio central y separados entre sí con una orientación de 120° de diferencia cada uno respecto al adyacente. Al iniciar el experimento, se coloca el animal en el centro del laberinto, siempre orientado hacia el mismo brazo, y se le permite explorar libremente el laberinto durante cinco minutos. Para grabar el recorrido que realiza el animal, se emplea una cámara ubicada directamente sobre el laberinto, en condiciones idóneas de luz para no interferir en la prueba. Entre cada sujeto de experimentación se procede a limpiar el laberinto con alcohol al 70%. El número de entradas del animal se emplea como marcador de la

actividad locomotora. El número de alternancias espontáneas, que se define como la entrada en los tres brazos diferentes de forma consecutiva, se denomina tríada y se emplea para evaluar la memoria a corto plazo. Al finalizar el ensayo, se calcula el porcentaje de alternancias espontáneas a partir del número de tríadas y las entradas totales siguiendo la siguiente ecuación: $Y = \frac{\text{número de tríadas}}{(\text{número total de entradas} - 2)} \times 100$ (107).

3.3.4.2 Test de reconocimiento de objetos

Las pruebas de reconocimiento de objetos se realizaron durante la primera semana de abstinencia. El test se realizó en un espacio rectangular de 38x40 cm y paredes de 54 cm de alto. Los animales se sometieron al estímulo de dos objetos idénticos suficientemente pesados como para que las ratas fueran incapaces de desplazarlos.

La prueba se dividió en tres fases:

- Primera fase: Fase de aclimatación. Se colocó al animal en el habitáculo correspondiente, y se le permitió explorar libremente los objetos y el espacio en que se encontraba durante cinco minutos.
- Segunda fase: A las dos horas, con la intención de medir la reacción del animal a corto plazo, se le introdujo en el mismo compartimento, con la peculiaridad de que se había cambiado uno de los dos objetos. De esta forma, se pudo comparar el tiempo de exploración empleado por la rata en cada uno de los objetos, el nuevo y el familiar.
- Tercera fase: A las 24 horas, para medir la variación de la conducta en un espacio de tiempo mayor, se introdujo al animal en el mismo compartimento, habiendo sustituido el objeto nuevo de la fase dos por otro con distintas características (es decir, hay un objeto al que en nuestros experimentos hemos denominado como familiar, que permanece invariable a lo largo de las tres fases).

Las tres fases fueron grabadas para su posterior análisis en el ordenador.

3.4. Determinación de parámetros bioquímicos

3.4.1. Cuantificación de factores neurotróficos circulantes en humano y rata.

Como a nivel metodológico el análisis de los niveles plasmáticos de factores tróficos se

realiza de manera idéntica tanto en el caso del plasma humano como en el plasma animal, el procedimiento a seguir en ambas especies se incluye integrado en un mismo apartado. Se midieron las concentraciones de las moléculas de estudio (BDNF, NT-3, IGF-1, IGF-2 e IGFBP-3) mediante el uso de KITs ELISA específicos para molécula y especie. Teniendo en cuenta que todos los protocolos eran similares, difiriendo tan solo en particularidades procedimentales de cada casa comercial pero manteniendo idéntico fundamento bioquímico, a continuación se explica el protocolo que se siguió para medir las concentraciones de BDNF en el plasma humano, sirviendo así como modelo explicativo del método.

Para realizar el ensayo, se añaden a tantos pocillos como sean necesarios (hasta un máximo de 96) las muestras y el estándar preparado (necesario para realizar la curva patrón por el método de diluciones sucesivas), seguido de la solución con el anticuerpo. Tras una primera incubación, se emplea el tampón de lavado para lavar los pocillos mediante aspiración o decantación, y así eliminar el material indeseado presente en la muestra. Se añade el sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametil-benzidina) y durante la incubación se producirá una reacción de coloración catalizada por la peroxidasa HRP, (Horse Radish Peroxidase) que en este protocolo va incluida en la solución de sustrato TMB. Tras un período de 10 minutos en el que se produce la reacción de coloración, se paraliza dicha reacción con la adición de la solución de parada, tornando cada pocillo a una coloración amarilla. La señal generada es proporcional a la cantidad del analito a medir, en nuestro caso BDNF. Las placas se leyeron a una longitud de 450nm en un espectrofotómetro Hitachi 737 Automatic Analyzer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) El protocolo descrito como ejemplo corresponde a la referencia: (#Ab212166 Human BDNF SimpleStep ELISA Kit). El resto de kits se encuentran detallados en los artículos adjuntos.

3.4.2. Cuantificación de las concentraciones de ARN mensajero en hipocampo de rata (PCR).

Extracción del ARN y análisis mediante RT-qPCR

Realizamos reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real (RT-PCR; TaqMan, ThermoFisher, Carlsbad, CA, USA) del mismo modo que el descrito en el artículo (108) usando primers específicos que se recogen en la Tabla S1 del estudio 2 de

esta tesis. A continuación, se describe brevemente el procedimiento empleado.

Se mantuvieron las muestras en hielo seco para su manipulación y se homogeneizaron siguiendo el método del Trizol®, ejecutando las instrucciones del fabricante (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD, USA). Las muestras de ARN fueron aisladas mediante los pasos apropiados y, tras la reacción de transcripción inversa a partir de 1 µg de ARN, se realizó la cuantificación a tiempo real de la PCR (RT-qPCR). Este proceso se llevó a cabo en un sistema de detección a tiempo real tipo CFX96TM (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) con el formato de detección mediante el fluoróforo FAM (TaqMan® Gene Expression Assays ThermoFisher). El análisis de las curvas de fusión se realizó para asegurar que solo había sido amplificada nuestra diana. Tras analizar varios genes de referencia, los valores obtenidos de las muestras de cerebro se normalizaron en relación a los niveles de β-actina (*Actb*).

3.4.3. Cuantificación de las cantidades de proteína en hipocampo de rata (Western Blot).

Para cuantificar la presencia de las moléculas implicadas en la cascada de señalización de BDNF (concretamente AKT, ERK y sus formas fosforiladas) realizamos la técnica de Western Blot. En primera instancia, se procedió a la extracción de proteínas mediante el uso de un tampón de lisis. Para medir la concentración de proteínas presente en el homogeneizado, se empleó la técnica “Bradford”. Después, se realizó la electroforesis, cargando las muestras según la concentración obtenida durante el “Bradford”, con el fin de cargar en todos los pocillos la misma concentración de proteína. Al finalizar la electroforesis, realizamos la transferencia a la membrana y finalmente se añadieron los anticuerpos primario y secundario necesarios para identificar la proteína de estudio. Por último, se introducen las membranas en el transiluminador para obtener la imagen que se cuantificará posteriormente de manera informatizada con el programa ImageJ (109). La relación de los anticuerpos empleados y una descripción más pormenorizada del protocolo puede consultarse en el apartado metodología de los estudios 2 y 3 de la presente Tesis Doctoral.

3.5. Análisis estadísticos

Todos los datos de las tablas y gráficos fueron expresados en número y porcentajes de sujetos [n (%)], medias y desviación estándar de las concentraciones [media (SD)] o

valores individuales de variables (correlaciones). Los análisis estadísticos se realizaron mediante los programas SPSS versión 22 (IBM, Armonk, NY, EE.UU.) y GraphPad Prism versión 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.).

3.5.1. Análisis y distribución de medias

Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente mediante pruebas de significación estadística aplicando contrastes de hipótesis mediante el “test de Fisher” en la comparación de dos grupos respecto a una variable dicotómica o la “prueba de chi-cuadrado (χ^2)” en la valoración de la relación entre dos variables cualitativas dicotómicas cada una de ellas. Consideramos un valor $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Las medias marginales estimadas se representan con 95% de intervalo de confianza (95% IC). Se empleó también el test de Análisis de la Varianza ANOVA con el test Post-hoc de Tukey y la prueba t de student para análisis de diferencias significativas entre variables divididas en más de dos grupos o en dos grupos respectivamente. En aquellas muestras que no cumplieren los criterios de normalidad, en lugar de aplicar la prueba t de student se aplicó la U de Mann-Whitney.

3.5.2. Análisis de correlaciones

Para los análisis de correlación lineal de dos variables aleatorias cuantitativas o continuas se empleó el “coeficiente de correlación de Pearson” (r) en supuestos de normalidad y se empleó el “coeficiente de Spearman” (ρ (rho)) para variables aleatorias continuas que no cumplen los supuestos de normalidad. Se consideró como significativo un valor $p < 0,05$.

3.5.3. Análisis de la covarianza

Se empleó el análisis de la covarianza (ANCOVA), modelo lineal general con una variable cuantitativa y uno o más factores. Mediante este análisis se consigue la homogeneidad en la variable dependiente debido a la influencia de las variables cuantitativas que se incluyan en el modelo. Un aumento de covariables puede elevar la potencia estadística. Para respetar la normalidad de las distribuciones, se realizaron transformaciones logarítmicas de los datos. Como análisis post-hoc se realizó el test de Sidak.

4. Resultados

4.1 Estudio 1:

**Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in
abstinent patients with alcohol use disorders.**

RESEARCH ARTICLE

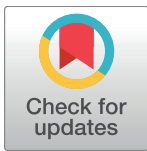
Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders

Nuria García-Marchena¹*, Daniel Silva-Peña¹*, Ana Isabel Martín-Velasco²*, María Ángeles Villanúa², Pedro Araos¹, María Pedraz¹, Rosa Maza-Quiroga¹, Pablo Romero-Sanchiz¹, Gabriel Rubio³, Estela Castilla-Ortega¹, Juan Suárez¹, Fernando Rodríguez de Fonseca^{1*}, Antonia Serrano^{1*}, Francisco Javier Pavón^{1*}

1 Unidad Gestión Clínica de Salud Mental, Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), Hospital Regional Universitario de Málaga, Universidad de Málaga, Málaga, Spain, **2** Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Instituto i+12, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* fernando.rodriguez@ibima.eu (FRF); antonia.serrano@ibima.eu (AS); javier.pavon@ibima.eu (FJP)



OPEN ACCESS

Citation: García-Marchena N, Silva-Peña D, Martín-Velasco AI, Villanúa MÁ, Araos P, Pedraz M, et al. (2017) Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. PLoS ONE 12(11): e0187634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634>

Editor: Kenji Hashimoto, Chiba Daigaku, JAPAN

Received: July 17, 2017

Accepted: October 23, 2017

Published: November 6, 2017

Copyright: © 2017 García-Marchena et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The present study has been supported by RETICS Red de Trastornos Adictivos (RD16/0017/0001) funded by Instituto de Salud Carlos III (ISC-III) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU); Research project funded by Ministerio de Economía y Competitividad and ISC-III (PI13/02261, PI16/01698 and PI16/01953); Research project funded by Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e

Abstract

The identification of growth factors as potential biomarkers in alcohol addiction may help to understand underlying mechanisms associated with the pathogenesis of alcohol use disorders (AUDs). Previous studies have linked growth factors to neural plasticity in neurocognitive impairment and mental disorders. In order to further clarify the impact of chronic alcohol consumption on circulating growth factors, a cross-sectional study was performed in abstinent AUD patients (alcohol group, N = 91) and healthy control subjects (control group, N = 55) to examine plasma concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 binding protein-3 (IGFBP-3). The association of these plasma peptides with relevant AUD-related variables and psychiatric comorbidity was explored. The alcohol group was diagnosed with severe AUD and showed an average of 13 years of problematic use and 10 months of abstinence at the moment of participating in the study. Regarding common medical conditions associated with AUD, we observed an elevated incidence of alcohol-induced liver and pancreas diseases (18.7%) and psychiatric comorbidity (76.9%). Thus, AUD patients displayed a high prevalence of dual diagnosis (39.3%) [mainly depression (19.9%)] and comorbid substance use disorders (40.7%). Plasma BDNF and IGF-1 concentrations were significantly lower in the alcohol group than in the control group ($p < 0.001$). Remarkably, there was a negative association between IGF-1 concentrations and age in the control group ($r = -0.52$, $p < 0.001$) that was not found in the alcohol group. Concerning AUD-related variables, AUD patients with liver and pancreas diseases showed even lower concentrations of BDNF ($p < 0.05$). In contrast, the changes in plasma concentrations of these peptides were not associated with abstinence, problematic use, AUD severity or lifetime psychiatric comorbidity. These results suggest that further research is necessary to elucidate the role of BDNF in alcohol-induced toxicity and the biological significance of the lack of correlation between age and plasma IGF-1 levels in abstinent AUD patients.

Igualdad and Plan Nacional sobre Drogas (PNSD 049/2013); Research project funded by Consejería de Economía, Innovación y Ciencia, Junta de Andalucía and ERDF-EU (CTS-433); Research projects funded by Consejería de Salud y Bienestar Social, Junta Andalucía (PI0228-2013). JS, AS and FJP hold Miguel Servet research contracts funded by ISC-III and ERDF-EU (CP12/03109, CP14/00173 and CP14/00212, respectively). EC-O holds a “Sara Borrell” research contract funded by ISC-III and ERDF-EU (CD12/00455).

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Alcohol consumption is one of the most important health problems in our society [1]. Chronic alcohol consumption can affect neurons and glial cells in the central nervous system (CNS), producing profound changes in synaptic structure and function. In fact, the toxic effects of alcohol exposure during early development may result in long-lasting behavioral and neuro-cognitive changes [2]; and excessive alcohol exposure during adulthood may lead to a chronic relapsing brain disease that receives the medical diagnosis of alcohol use disorder (AUD) [3]. Currently, AUD is a single disorder that integrates both alcohol abuse and alcohol dependence and is characterized by compulsive alcohol use, loss of control over alcohol intake, and a negative emotional state emerging in conjunction with withdrawal and protracted abstinence [3–4]. AUD is commonly associated with cognitive and memory impairment during development with a higher incidence of comorbid mental disorders, particularly depression and anxiety [5], and other organic comorbid diseases (e.g., alcohol liver diseases) [3, 6].

Research in alcohol addiction has reported the existence of areas of the brain that may be particularly vulnerable to alcohol toxicity through interference with the activity of cell-signaling systems, particularly growth and trophic factors [7–8]. Indeed, studies in preclinical and clinical models of AUD provide evidence of the role of neurotrophic factors in alcohol-induced cognitive decline in brain areas, including the basal forebrain-cortex system [9–10].

Growth factors are a set of proteins known to play a crucial role in cellular growth, proliferation and differentiation in the CNS. These factors are produced by several cells (e.g., noradrenergic, dopaminergic, cholinergic neurons and astrocytes) and have been extensively studied because of their implications in the development of neuroadaptations in the CNS but also in the immune and endocrine systems [11–12].

Among the different families of growth factors, the neurotrophin family has received much attention for its role in neuropsychiatric conditions such as Alzheimer’s disease, Huntington’s disease and bipolar disorder [11–13]. This family is composed of neurotrophic peptides such as nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 and neurotrophin 4. BDNF is a neurotrophic factor abundantly expressed in the CNS and in peripheral tissues acting through the *trkB* receptor [14]. BDNF plays a prominent role in cognitive processes such as learning, memory and behavioral consolidation [15], and alterations in BDNF concentration can be observed in mental disorders, particularly with depression [16]. In fact, the presence of depressive disorders is associated with lower levels of trophic support in clinical and preclinical models [16–18]. Regarding drug addiction, BDNF reduces the motivation and behavioral effects of alcohol consumption and is associated with decreased alcohol consumption [19]. In alcohol-dependent patients, serum BDNF has been reported to be associated with withdrawal severity (i.e., somatic symptoms, tolerance, craving and alcohol consumption to avoid withdrawal symptoms) [20].

Insulin-like growth factors (IGFs) are another family of proteins that are part of a complex signaling system that includes IGFs (i.e., IGF-1 and IGF-2), receptors, IGF-binding proteins and proteases. IGF-1 is cytoprotectant [21] and changes in this peptide signaling may be involved in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders, including anxiety and depression [22–23]. In clinical models, IGF-1 has been related to the persistence of associated memories related to drug reinforcement in alcohol craving and opiate dependence [24–25]. Associated with IGF-1, IGFBP-3 is a binding protein in humans that prolongs the half-life of IGF-1 and, with respect to the deleterious effects of alcohol, IGFBP-3 may be involved in the length of alcohol abstinence [26].

One interesting aspect is the potential evaluation of these factors in the plasma because they circulate in the blood and can cross the blood-brain barrier to exert their effects [27].

Therefore, although much work is still needed to identify the effect of chronic alcohol consumption on those growth factors regulating the functional integrity of the CNS, it is feasible to hypothesize that AUDs are associated with alterations in the circulating levels of main growth factors.

Because the search for peripheral biomarkers of AUD has increased notably over the last few years, we designed an exploratory and descriptive cross-sectional study in a cohort of abstinent alcohol-addicted patients from outpatient treatment programs to examine plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3. Consequently, the main objective of this study was to explore associations between these plasma peptides and relevant AUD-related variables (i.e., alcohol abstinence, problematic alcohol use, alcohol symptom severity, alcohol-induced liver and pancreas diseases) and psychiatric comorbidity, which were established using psychiatric and clinical assessments.

Materials and methods

Subjects and recruitment

The present cross-sectional study included 146 participants (White Caucasian) divided into two groups: i) an alcohol group (91 patients with AUD) and ii) a control group (55 healthy control subjects).

The initial procedure for recruiting was non-random convenience sampling according to the participation criteria, which were established at the beginning of the study: Ninety-five patients were initially recruited from active outpatient treatment programs in *Hospital Universitario 12 de Octubre* (Madrid, Spain) for a period of 18 months (from November 2013 to May 2015); sixty control individuals were recruited from multidisciplinary staff working at the *Hospital Universitario 12 de Octubre* and *Universidad Complutense de Madrid* (Madrid, Spain) and matched for age, sex and body mass. The eligibility of all participants was subsequently corroborated using both clinical assessments and plasma tests, and 9 participants were excluded from the study.

Participation criteria. The participation was absolutely voluntary, but all participants had to meet eligibility criteria based on inclusion and exclusion criteria for the study.

Alcohol group. Inclusion criteria included the following: age ≥ 18 years up to 65 years of age, lifetime AUD diagnosis and at least 4 weeks of abstinence. The exclusion criteria of the alcohol group were as follows: the presence of infectious diseases, personal history of cancer, incapacitating cognitive alterations and pregnancy. Four abstinent AUD patients were excluded from the initial cohort according to the exclusion criteria.

Control group. Control subjects were matched for sex, age and body mass with abstinent AUD patients and they were required to be ≥ 18 years to 65 years of age. The exclusion criteria were personal history of drug abuse and/or dependence (i.e., lifetime AUD or other substance use disorders), lifetime psychiatric disorders, the presence of infectious diseases, personal history of cancer, incapacitating cognitive alterations and pregnancy. Five control subjects were excluded from the study.

Ethics statement

Written informed consent was obtained from each participant after a complete description of the study. All participants had the opportunity to discuss any questions or issues. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the *Hospital Regional Universitario de Málaga* (CP14/00173 and PI13/02261) in accordance with the “Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects” adopted in the Declaration of Helsinki by the World Medical Association (64th WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013), Recommendation No. R (97) 5 of the Committee of Ministers to Member States on the Protection of

Medical Data (1997), and the Spanish Data Protection Act (*Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos*, LOPD). All collected data were coded to maintain privacy and confidentiality.

Clinical assessments

Prior to the clinical assessments, the “Trail Making Test” (TMT) Part B was easily administered to all participants as a memory and attention-screening test to detect cognitive alterations [28]. The primary psychiatric assessment tool was the Spanish version of the “Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases” (PRISM) according to “Diagnostic and Statistical Manual of mental Disorders-4th Edition-Text Revision” (DSM-IV-TR) criteria [29–30]. This semi-structured interview has demonstrated good psychometric properties in terms of test-retest reliability and inter-rater reliability and validity. Lifetime prevalence was used to present the frequency of substance use disorders and other mental disorders, taking into account “current” (criteria were met within the past year) and “past diagnoses” (criteria were met before the previous 12 months). The control group was evaluated by the Spanish version of the “Composite International Diagnostic Interview” (CIDI) to detect psychiatric disorders [31].

Alcohol symptom severity was assessed by combining the DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence: 4 abuse criteria (one symptom is necessary for diagnosis of abuse); and 7 dependence criteria (for diagnosis of dependence three or more co-occurring symptoms in a 12-month period are required) [32].

Psychologists who had received PRISM and CIDI training performed all the interviews.

Collection of plasma samples and rapid analyses

Blood samples were obtained in the morning (9:00–11:00 a.m.) after fasting for 8–12 h (previous to the psychiatric interviews). Venous blood was extracted into 10mL K₂ EDTA tubes (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and was immediately processed to obtain plasma. All blood samples were centrifuged at 2,200 x g for 15 min (4°C) and individually assayed for detecting infectious diseases by three commercial rapid tests for HIV, hepatitis B, and hepatitis C [33]. Samples displaying infection were discarded following safety protocols. Additionally, the blood alcohol concentration was measured according to the alcohol oxidase reaction using an Analox AM1 analyzer (Analox Instruments, Stourbridge, UK).

Finally, plasma samples were individually characterized, registered (code number), and stored at -80°C until further analyses.

Multiplex immunoassays for BDNF

A Bio-Plex Suspension Array System 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) was used to quantify the plasma concentrations of growth factors and other related peptides [34]. Human protein panels were used to detect the BDNF levels and other analytes that were recently published [33]. However, commercially available human ELISA kits are unable to distinguish between precursors of BDNF and mature BDNF because of limited BDNF antibody specificity [35]. Raw data (mean fluorescence intensity) were analyzed using the Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA). BDNF concentrations were expressed as pg/mL.

Radioimmunoassay analysis for IGF-1 and IGFBP-3

As previously described [32], plasma concentrations of total IGF-1 were estimated by double antibody radioimmunoassay (RIA), after removal of serum IGFBPs by acid-ethanol extraction.

To confirm the removal of IGFBPs, extracted and non-extracted plasma fractions were incubated with ^{125}I -IGF-1 at 4°C for 24 h. Dextran charcoal was used to separate the bound and free tracers. The IGF-1 antiserum (UB2-495) was a gift from Drs. Underwood and Van Wisk distributed by the Hormone Distribution Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) through the National Hormone and Pituitary Program. Concentrations of IGF-1 were expressed in terms of rat IGF-1 from Gropep Bioreagents Pty Ltd. (Adelaide, SA, Australia) as ng/mL. A plasma IGFBP-3 concentration was determined in duplicate by RIA using a commercially available kit (Mediagnost GmbH, Reutlinger, Germany) following the manufacturer's instructions. IGFBP-3 concentrations were expressed as $\mu\text{g/mL}$.

Statistical analysis

All data in tables are expressed as the number and percentage of subjects [N (%)] or mean and standard deviation (SD) of concentrations [mean (SD)]. The significance of differences in categorical and normal continuous variables was determined using Fisher's exact test (chi-square test) and Student's *t*-test, respectively.

Statistical analysis of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 concentrations was performed using analysis of covariance (ANCOVA) as a general linear model to indicate the relative effect of explanatory variables and their interactions on the expression of these peptides in plasma, controlling for covariates. Therefore, the ANCOVA models included AUD-related variables as categorical and continuous independent variables to explore their association with plasma BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 concentrations. Prior to the selection and inclusion of independent variables in these analyses, the ANCOVA assumptions regarding the independence of covariates and homogeneity of regression slopes were evaluated based on parametric assumptions. Log (10)-transformation for peptide concentrations was used to ensure parametric assumptions for positively skewed distributions and estimated marginal means [95% confidence intervals (95% CI)] were expressed and represented in the figures after back-transformation when those criteria were met. *Post hoc* comparisons were performed using Sidak's correction test.

In addition, correlation analyses between peptide concentrations and independent variables were performed using the Pearson's correlation coefficient (*r*).

A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism version 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and IBM SPSS Statistical version 22 software (IBM, Armonk, NY, USA).

Results

Sample demographics

This study included 146 participants, who were divided into alcohol (N = 91) and control (N = 55) groups. **Table 1** shows a socio-demographic description of the sample. The average participant in the alcohol group was a 48-year-old male with a BMI of 26. Significant differences were observed between the two groups with respect to marital status ($p < 0.01$), education ($p < 0.05$), occupation ($p < 0.001$) and medication use ($p < 0.001$). Thus, the alcohol group was characterized by a higher prevalence of marital separation, a lower education level and a higher unemployment rate relative to the control group. Unlike the control participants, abstinent AUD patients had taken psychotropic medication in the last year: 44% antidepressants, 32% anxiolytics, 33% anticonvulsants and 9% antipsychotics. In addition to psychiatric medication use, 67 AUD patients were treated with *disulfiram* in the last 12 months.

Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to alcohol use disorders

The effect of AUD on the plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in male and female participants (N = 97 men and N = 49 women) was investigated using a two-way ANCOVA (“lifetime AUD” and “sex” as factors), controlling for “age” and “BMI”. Data were examined, and a base-10 logarithmic transformation of the concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 was performed. Back-transformed marginal means on the original scale are shown in Fig 1. We observed different effects of the independent variables on the expression of both growth factors and IGFBP-3 in plasma.

The statistical analysis revealed a main effect of “lifetime AUD” on BDNF concentrations ($F_{(1,138)} = 39.597$; $p < 0.001$) (Fig 1A). This effect resulted in decreased levels of BDNF in the alcohol group compared with those measured for the control group [127.35 (95% CI = 98.17–165.19) pg/mL and 483.05 (95% CI = 348.33–671.42) pg/mL, respectively], with no effect of “sex” or interaction.

Similarly, the plasma concentrations of IGF-1 were significantly affected by “lifetime AUD” ($F_{(1,138)} = 42.522$; $p < 0.001$) (Fig 1B). Thus, the alcohol group had lower levels of IGF-1 than the control group [140.42 (95% CI = 125.89–154.95) ng/mL and 218.62 (95% CI = 199.99–237.26) ng/mL, respectively]. There was no effect of “sex” or interaction between factors on IGF-1 concentrations. In addition to the “lifetime AUD” effect, plasma IGF-1 concentrations were strongly affected by the covariate “age” ($F_{(1,138)} = 14.303$; $p < 0.001$).

Finally, the plasma concentrations of IGFBP-3 were not affected by any of the factors examined, “lifetime AUD” or “sex”, and there was no interaction effect (Fig 1C).

Correlation analysis between age and plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3

Because IGF-1 concentrations were significantly affected by age, we examined the relationship between age and plasma concentrations of this peptide in the total sample using correlation analysis (Fig 2).

Table 1. Baseline socio-demographic variables.

| Variable | | Alcohol group (N = 91) | Control group (N = 55) | p-value |
|------------------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| Age [mean (SD)] | Years | 47.91 (7.69) | 45.15 (10.06) | 0.083 ^a |
| BMI [mean (SD)] | kg/m ² | 25.86 (3.89) | 24.82 (3.37) | 0.090 ^a |
| Sex [N (%)] | Women | 30 (33.0) | 19 (34.5) | 0.847 ^b |
| | Men | 61 (67.0) | 36 (65.5) | |
| Marital status [N (%)] | Single | 29 (31.8) | 29 (52.7) | <0.01 ^b |
| | Cohabiting | 32 (35.2) | 21 (38.2) | |
| | Separated | 28 (30.8) | 5 (9.1) | |
| | Widow | 2 (2.2) | - | |
| Education [N (%)] | Elementary | 31 (34) | 6 (10.9) | <0.05 ^b |
| | Secondary | 32 (35.2) | 16 (29.1) | |
| | University | 28 (30.8) | 33 (60.0) | |
| Occupation [N (%)] | Employed | 48 (52.7) | 51 (92.7) | <0.001 ^b |
| | Unemployed | 43 (47.3) | 4 (7.3) | |
| Psychiatric medication use [N (%)] | No | 26 (28.6) | 64 (100) | <0.001 ^b |
| | Yes | 65 (71.4) | - | |

Abbreviations: BMI = body mass index

^a p-value from Student’s t-test

^b p-value from Fisher’s exact test or chi-square test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634.t001>

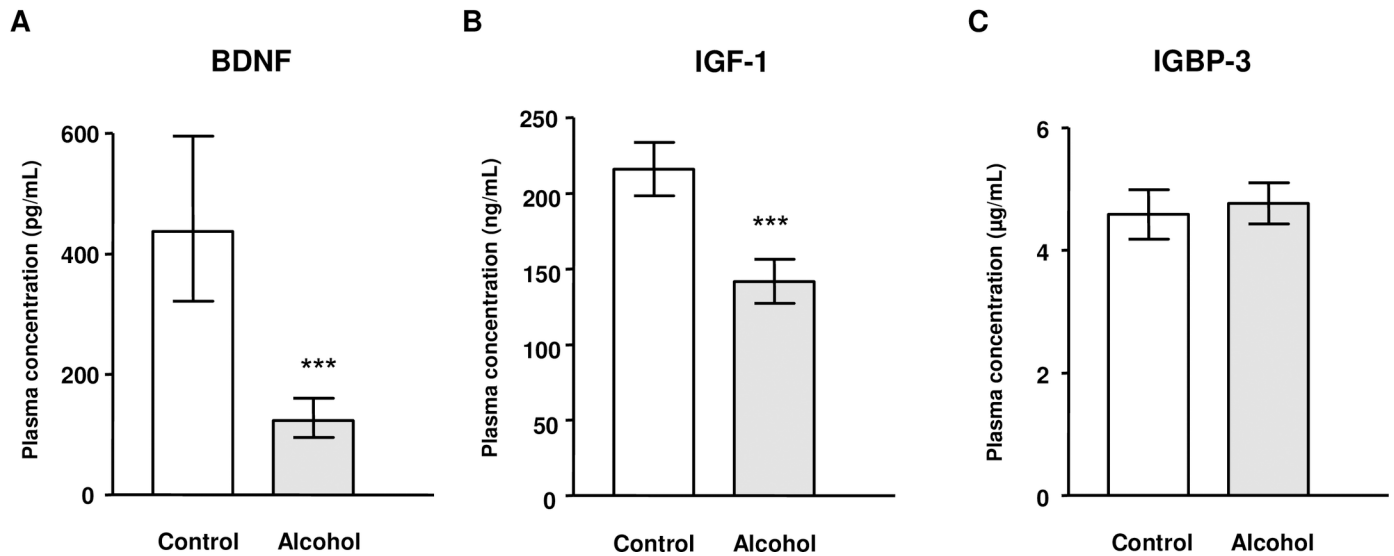


Fig 1. Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in the alcohol and control groups. (A) BDNF (pg/mL); (B) IGF-1 (ng/mL); and (C) IGFBP-3 (µg/mL). Bars are the back-transformed means and 95% CI from logarithmic data. (***) $p < 0.001$ denotes significant differences between the alcohol and control groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634.g001>

As shown in Fig 2A, there was a negative correlation between age and IGF-1 concentrations ($r = -0.377$, $p < 0.001$) in the total sample. When both groups were separately examined, we found a strong association between age and IGF-1 in the control group ($r = -0.517$, $p < 0.001$) but not in the alcohol group. Additional correlation studies revealed that age was not associated with the plasma concentrations of BDNF (Fig 2B) and IGFBP-3 (Fig 2C). However, we found a significant correlation between age and IGFBP-3 concentrations ($r = -0.291$, $p < 0.05$) in the control group.

Finally, we analyzed the relationship between the concentrations of IGF-1 and IGFBP-3. There was a positive correlation ($r = +0.288$, $p < 0.001$) in the total sample (Fig 2D) that was also observed in both groups: $r = +0.527$, $p < 0.001$ in the control group; and $r = +0.227$, $p < 0.05$ in the alcohol group.

Clinical characteristics of abstinent patients with alcohol use disorders

Abstinent AUD patients participating in the present study were clinically characterized with relevant variables associated with the diagnosis of lifetime AUD (Table 2). Thus, the alcohol group showed an average of 10.5 months of alcohol abstinence and 13.4 years of problematic alcohol use at the moment of evaluation. Regarding alcohol symptom severity, the alcohol participants were diagnosed with an average of 6.9 DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence, which corresponds to severe AUD.

Because liver and pancreas diseases are common and identifiable alcohol-associated health problems among subjects with AUD, we did not exclude these patients in the present study. Specifically, 8 abstinent AUD patients were previously diagnosed with steatosis, 5 patients with cirrhosis and 4 patients with pancreatitis. These AUD patients with alcohol-related diseases (6 women and 11 men) showed an average of 5.3 (SD = 3.2) months of alcohol abstinence, 15.6 (SD = 8.1) years of problematic alcohol use and 6.7 (SD = 2.3) DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence.

Psychiatric comorbidity. In addition to these variables, we found a high prevalence of lifetime psychiatric comorbidity in the alcohol group (76.9%). We distinguished between

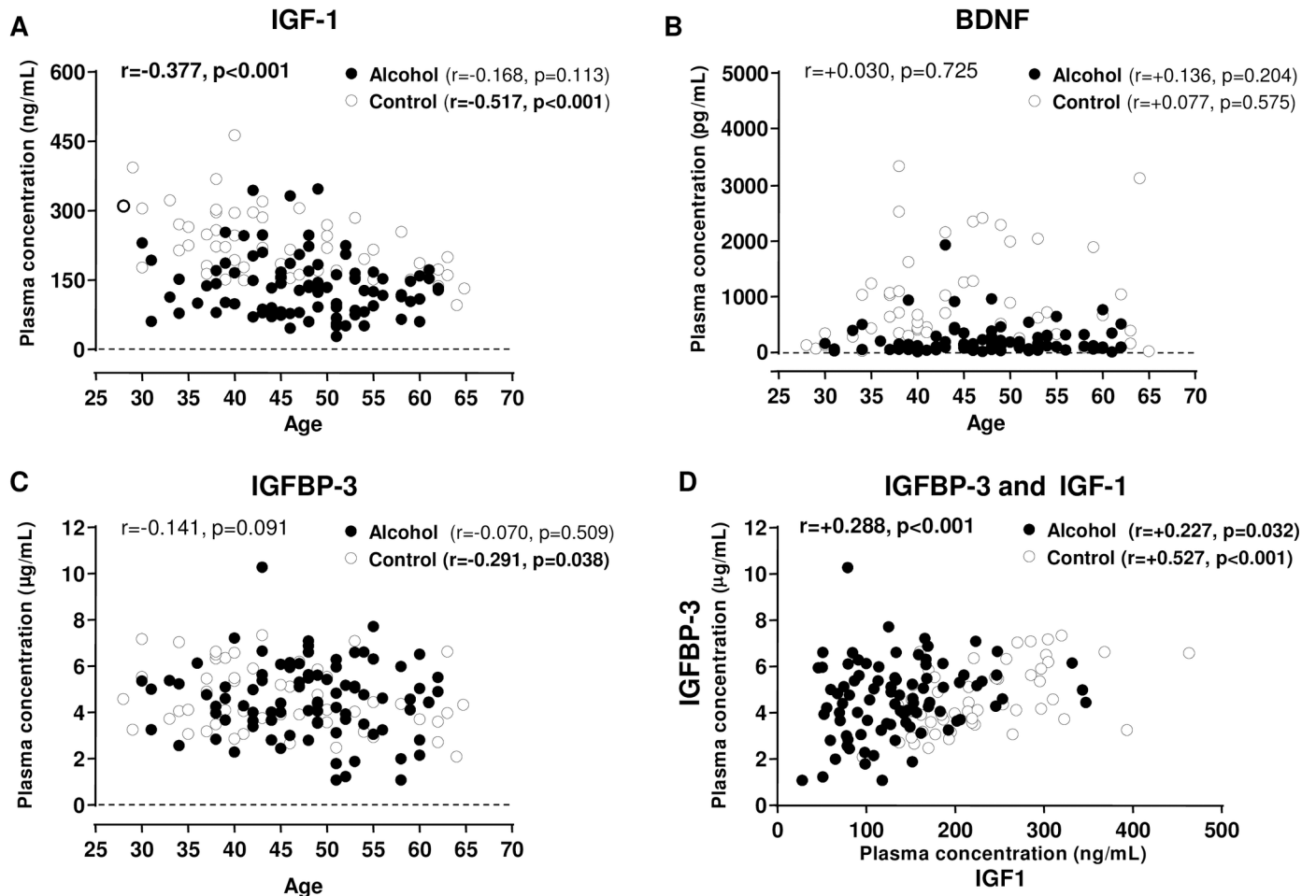


Fig 2. Correlation analysis between age and plasma concentrations of IGF-1, BDNF and IGFBP-3. (A) IGF-1 (ng/mL) and age (years) in the total sample; (B) BDNF (pg/mL) and age (years) in the total sample; (C) IGFBP-3 (µg/mL) and age (years) in the total sample; (D) IGF-1 (ng/mL) and IGFBP-3 (µg/mL) in the total sample. Dots represent individual raw values. The Pearson correlation coefficient (r) and p -value are indicated for statistical significance. Note: One outlier value (4.313 pg/mL and 60 years old) was not represented.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634.g002>

comorbid substance use disorders and mental disorders or dual diagnosis for better characterization.

Regarding comorbid substance use disorders, the highest prevalence was observed for cocaine (73%) and cannabis (41%). AUD patients with comorbid substance use disorders (7 women and 30 men) showed an average of 9.7 (SD = 11.8) months of alcohol abstinence, 13.1 (SD = 7.1) years of problematic alcohol use and 7.5 (SD = 2.8) DSM-IV-TR criteria for alcohol abuse and dependence. Five comorbid AUD patients (13.5%) had alcohol-related liver and pancreas diseases. Interestingly, these comorbid AUD patients showed an increased prevalence of dual diagnosis (81%), mainly mood disorders (57%) and personality disorders (41%).

According to comorbid mental disorders, the highest prevalence was observed for mood disorders (77%). AUD patients with dual diagnosis (23 women and 38 men) showed an average of 13.4 (SD = 17.9) months of alcohol abstinence, 13.0 (SD = 6.7) years of problematic alcohol use and 7.0 (SD = 2.4) DSM-IV-TR criteria for AUD. In this case, 8 comorbid AUD patients (13.1%) had alcohol-related liver and pancreas diseases.

Table 2. Variables associated with AUD and psychiatric comorbidity in the alcohol group.

| Variable | Alcohol group (N = 91) |
|--|----------------------------------|
| Alcohol abstinence [mean (SD)] | months 10.5 (15.3) |
| Problematic alcohol use [mean (SD)] | years 13.4 (7.4) |
| Severity of AUD [mean (SD)] | DSM-IV-TR criteria 6.86 (2.27) |
| Liver and pancreas diseases [N (%)] | No 74 (81.3) |
| | Yes 17 (18.7) |
| Other lifetime substance use disorders [N (%)] | No 54 (59.3) |
| | Yes 37 (40.7) |
| | Cocaine 27 (29.7) |
| | Cannabis 15 (16.5) |
| | Sedatives 3 (3.3) |
| | Stimulants 6 (6.6) |
| Other lifetime mental disorders [N (%)] | No 24 (26.4) |
| | Yes 67 (73.6) |
| | Mood 47 (51.6) |
| | Anxiety 17 (18.7) |
| | Psychotic 6 (6.6) |
| | Borderline Personality 15 (16.5) |
| | Antisocial Personality 7 (7.7) |

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634.t002>

Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to variables related to alcohol use disorders

We evaluated the effects of variables associated with AUD on the plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in the alcohol group using an ANCOVA, controlling for age. We selected the duration of alcohol abstinence (“abstinence”), the duration of problematic alcohol use (“problematic use”) and the prevalence of alcohol-induced liver and pancreas diseases (“alcohol-induced diseases”) as variables of interest in our analyses. Back-transformed marginal means on the original scale are shown in [Fig 3](#).

The statistical analysis revealed a main effect of “alcohol-induced diseases” on BDNF concentrations ($F_{(1,84)} = 5.751, p = 0.019$) ([Fig 3A](#)). In fact, abstinent AUD patients with liver and/or pancreas diseases had lower BDNF concentrations relative to AUD patients with no disease [74.41 (95% CI = 43.77–126.51) pg/mL and 152.18 (95% CI = 118.15–196.03), respectively]. In contrast, the plasma concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 were not significantly affected by “alcohol-induced diseases” ([Fig 3B](#) and [Fig 3C](#), respectively).

Regarding “abstinence” and “problematic use”, we observed no significant effects on plasma concentrations of BDNF, IGF-1 or IGFBP-3. Similarly to previous analyses in the total sample, plasma concentrations of IGF-1 were significantly affected by the covariate “age” ($F_{(1,85)} = 5.253; p = 0.024$).

Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in relation to psychiatric comorbidity. Because of the high incidence of psychiatric comorbidity, we analyzed the effects of this additional psychiatric condition on the plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 using ANCOVA. The model also included “alcohol-induced diseases”, controlling for “medication use” and “age”. Complementarily, we distinguished between comorbid substance use disorders and comorbid mental disorders.

However, we found no significant effects of psychiatric comorbidity on the expression of these peptides in the plasma of abstinent AUD patients. Back-transformed marginal means are shown in [S1 Table](#).

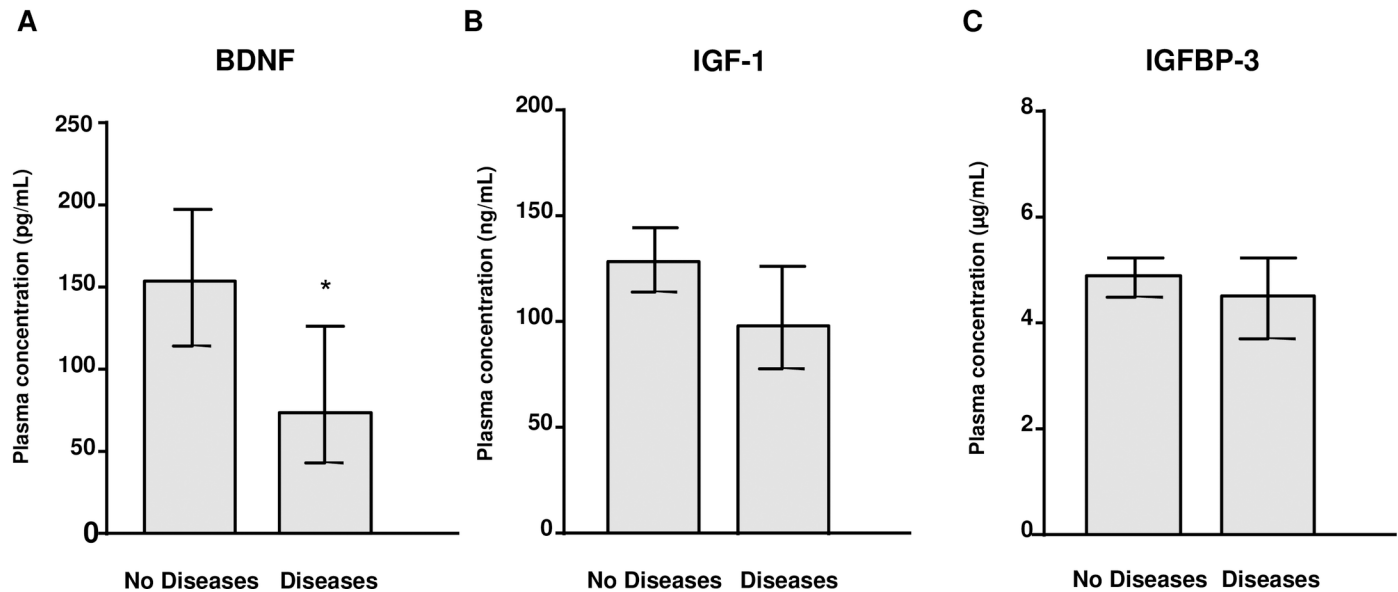


Fig 3. Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in the alcohol group according to alcohol-induced liver and pancreas diseases. (A) BDNF (pg/mL); (B) IGF-1 (ng/mL); and (C) IGFBP-3 (µg/mL) in alcohol group. Bars are the back-transformed means and 95% CI from logarithmic data. (*) $p < 0.05$ denotes significant differences between the disease and no-disease subgroups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634.g003>

Discussion

In the present study, we examined BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 concentrations in the plasma of abstinent AUD patients, who were recruited from active outpatient treatment programs, and healthy subjects. Additionally, these abstinent patients were clinically characterized through psychiatric interviews based on the DSM-IV-TR, and main AUD-related variables were determined (i.e., alcohol abstinence, problematic alcohol use, alcohol symptom severity, alcohol-induced liver and/or pancreas diseases and psychiatric comorbidity). The association of these plasma peptides and AUD-related variables was analyzed using ANCOVA models to identify potential biomarkers of lifetime AUD.

The main findings are as follows: a) Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 were significantly lower in the alcohol group than in the control group; b) there was a strong correlation between IGF-1 concentrations and age in the control group that was not observed in the alcohol group; c) AUD patients with alcohol-induced liver and/or pancreas diseases showed even lower concentrations of BDNF than other AUD patients; d) in contrast, BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 concentrations were not statistically affected by other AUD-related variables such as abstinence, problematic alcohol use, alcohol symptom severity or psychiatric comorbidity.

Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 are altered in abstinent patients with alcohol use disorders

Because of their role in CNS development, growth factors have been studied in neuroplasticity modulation and behavioral effects derived from alcohol-induced toxicity [12, 36–37]. For instance, nerve growth factor (NGF) is a growth factor linked to inflammatory and endocrine responses that has been reported to be altered in the blood of alcohol-dependent patients [38–39]. Our data pertaining to BDNF and IGF-1 support growth factors could be linked to alcohol dependence. Thus, the decreased levels of BDNF and IGF-1 in patients with AUD that we observed are in accord with other studies in alcohol, which have reported an association

between decreased BDNF levels and alcohol intoxication [36] and between inhibited IGF-1 bioavailability and chronic alcohol abuse [40]. However, we found no associations between these decreased levels in plasma and relevant variables associated with AUD, such as abstinence, problematic alcohol use or severity of the AUD.

The long-term persistence of the alcohol-induced inhibition of circulating BDNF and IGF-1 is remarkable because our AUD cohort had an average of 10 months of abstinence. In fact, we found no association between these peptides and the duration of abstinence. In contrast, other studies have shown that BDNF and IGF-1 levels are altered differently by the duration of abstinence. Thus, a decrease in plasma BDNF concentrations has been reported after one month of hospitalization [41], in line with the trend indicated by our data. In contrast, other studies in alcohol populations with shorter durations of abstinence describe elevated concentrations of BDNF within the first 24 h after admission [42] and one week after alcohol withdrawal [43]. Interestingly, while D'sa and colleagues observed higher BDNF levels in the serum of alcohol-dependent subjects with 4 weeks of controlled abstinence relative to social drinkers, no changes in plasma BDNF levels were reported [44]. Regarding IGF-1, a clinical study with alcohol-addicted patients reported low levels of serum IGF-1 relative to those measured in non-addicted subjects, but these levels increased after 2–5 days of abstinence [40]. Because we have not studied the course of acute abstinence but rather plasma concentrations in a cross-sectional design, our data cannot be compared with those reflecting transient increments during abstinence. Furthermore, there are additional differences in experimental design among studies concerning the blood compartment that is analyzed (e.g., plasma *vs.* serum) and the treatment programs examined (e.g., outpatient *vs.* inpatient).

The association between plasma IGF-1 levels and age is not observed in abstinent patients with alcohol use disorders

Growth factors are important in the maintenance of the neural homeostatic conditions in the CNS during aging [45]. Thus, the neuroprotective activity of growth factors has been extensively studied, and reports have revealed that the expression of peptides such as IGF-1 is related to life span and longevity [46]. In fact, IGF-1 function is decreased in the brain during aging [47]. Accumulating evidence reveals that circulating levels of IGF-1 also significantly affect cognitive brain function and are reduced in the elderly [48]. In agreement, we previously reported that plasma IGF-1 concentrations are negatively correlated with age in an exploratory study with cocaine users and healthy subjects [32], with no effects of chronic cocaine consumption on the expression of this growth factor. In the present study, we also found a strong correlation between plasma IGF-1 and age in the control group, but unlike in the cocaine study, there was no association between both variables in abstinent AUD patients. Our data reveal that subjects with chronic alcohol consumption (13 years of problematic use) show lower IGF-1 concentrations than those of control subjects within the same age range. These findings are concordant with the fact that chronic excessive alcohol consumption induces cognitive impairments [49].

Plasma BDNF levels are decreased in abstinent patients with alcohol-induced liver and/or pancreas diseases

Growth factor deficiencies have been linked to oxidative and inflammatory states in vascular dysfunctions, diabetes and other important diseases in accessory organs [50–51]. In fact, active drinking with AUD and the presence of an intense inflammatory response are associated with organ failure and high short-term mortality [52]. According to our results, the prevalence of AUD participants with alcohol-induced diseases in accessory organs (i.e., liver and pancreas)

was 19%, and these patients showed lower BDNF concentrations. We found no study in the literature about the association between BDNF expression in the blood and alcoholic pancreatitis or alcoholic liver disease, and only some studies have associated alterations in BDNF with non-alcoholic chronic pancreatitis [53] and non-alcoholic hepatitis [54]. Furthermore, BDNF concentrations has been reported to be associated with impairment of physical aspects of quality of life in patients with hepatitis C, and this association is independent of drug abuse status, mental problems, treatment or cirrhosis severity [54]. Although IGF-1 and IGFBP-3 have been reported to be altered in previous studies performed in atherosclerosis and other cardiovascular diseases, we found no significant differences between the two peptides among patients with hepatitis, cirrhosis or pancreatitis [55–56].

Plasma BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 levels are not associated with psychiatric comorbidity

Numerous studies have suggested that growth factors play important roles in psychiatric disorders. Thus, BDNF has been found to be reduced in depression and anxiety disorders in clinical studies [57–58], while IGF-1 has been associated with the etiology of depression [59], particularly in learning and memory deficits, correlating with fatigue, tension and anxiety [60–61]. In our alcohol group, we found a high prevalence of psychiatric comorbidity [dual diagnosis (39%), e.g., depression (20%), anxiety (7%) and borderline personality disorders (7%); and comorbid substance use disorders (41%), e.g., cocaine (30%) and cannabis (17%)], but we observed no association between plasma concentrations of these peptides and the diagnosis of psychiatric comorbidity. In contrast, dysregulation of growth factors in the CNS has been associated with comorbid mental disorders, particularly BDNF and NGF [37, 62]. In fact, we reported an association between BDNF concentrations and comorbid mood disorders in patients with cocaine use disorders [32].

Limitations and future perspectives

This exploratory study examined the effects of AUD-related variables on the expression of main growth factors in the plasma of abstinent AUD patients to identify and explore new molecular tools and potential biomarkers in the pathogenesis of drinking problems, in particular, AUD and alcohol-induced medical complications.

Although our findings support the importance of monitoring growth factors in the context of AUD and related diseases, we are aware of the limitations of this cross-sectional study. First, we must consider that unlike inpatient treatment programs, the recruitment and selection of the sample was conducted from outpatient programs. Second, the validity of the present results must be assessed in a larger sample of AUD patients, and additional experimental groups should be included (e.g., subjects with mental disorders but with no substance use disorders, active alcohol-drinking subjects). Third, a longitudinal study is also needed to monitor changes in growth factors according to the duration of alcohol abstinence in the same patients. Complementarily, preclinical studies will be able to elucidate the potential association between these circulating peptides and abstinence. Fourth, there is a growing number of socio-demographic variables that could influence the expression of growth factors, but they were not included in the present analyses because of the relative small sample size, statistical restrictions and differences in the source of recruitment.

In conclusion, these findings support that alterations in circulating growth factors are associated with a personal history of AUD. Monitoring circulating growth factors such as BDNF and IGF-1 could help stratify subjects with AUD during the different phases of alcohol detoxification programs and predict treatment outcomes. Further investigation is needed to explore

the potential role of BDNF as an indicator or biomarker of inflammatory pancreas and liver diseases associated with chronic alcohol consumption. Finally, the biological significance of the lack of correlation between age and plasma IGF-1 levels in abstinent AUD patients must be investigated.

Supporting information

S1 Table. Plasma concentrations of BDNF, IGF-1 and IGFBP-3 in the alcohol group according to psychiatric comorbidity.

(PDF)

S1 File. Database.

(XLSX)

Acknowledgments

The authors thank the participants and the psychiatry research support staff for their generosity and interest, which made this study possible.

Author Contributions

Conceptualization: Fernando Rodríguez de Fonseca, Antonia Serrano, Francisco Javier Pavón.

Data curation: Francisco Javier Pavón.

Formal analysis: Nuria García-Marchena, Rosa Maza-Quiroga, Francisco Javier Pavón.

Funding acquisition: Fernando Rodríguez de Fonseca, Antonia Serrano, Francisco Javier Pavón.

Investigation: Nuria García-Marchena, Pedro Araos, María Pedraz, Pablo Romero-Sanchiz, Gabriel Rubio.

Methodology: Nuria García-Marchena, Daniel Silva-Peña, Ana Isabel Martín-Velasco, María Ángeles Villanúa, Pedro Araos, María Pedraz, Rosa Maza-Quiroga, Estela Castilla-Ortega, Juan Suárez.

Supervision: Fernando Rodríguez de Fonseca, Antonia Serrano, Francisco Javier Pavón.

Writing – original draft: Fernando Rodríguez de Fonseca, Francisco Javier Pavón.

Writing – review & editing: Fernando Rodríguez de Fonseca, Antonia Serrano, Francisco Javier Pavón.

References

1. Organization WH. Management of Substance Abuse Unit. Global status report on alcohol and health, 2014. World Health Organization. 2015.
2. Klintsova AY, Hamilton GF, Boschen KE. Long-term consequences of developmental alcohol exposure on brain structure and function: therapeutic benefits of physical activity. *Brain Sci.* 2012; 3(1):1–38. Epub 2012/01/01. doi: <https://doi.org/10.3390/brainsci3010001> [pii] PMID: 24961305; PubMed Central PMCID: PMC4061829.
3. Gitto S, Golfieri L, Caputo F, Grandi S, Andreone P. Multidisciplinary View of Alcohol Use Disorder: From a Psychiatric Illness to a Major Liver Disease. *Biomolecules.* 2016; 6(1):11. Epub 2016/01/20. doi: <https://doi.org/10.3390/biom6010011> [pii] PMID: 26784248; PubMed Central PMCID: PMC4808805.

4. Bartoli F, Carra G, Crocamo C, Clerici M. From DSM-IV to DSM-5 alcohol use disorder: an overview of epidemiological data. *Addict Behav.* 2015; 41:46–50. Epub 2014/10/12. doi: S0306-4603(14)00320-7 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2014.09.029> PMID: 25305657.
5. Garcia Marchena N, Araos P, Pavon FJ, Ponce G, Pedraz M, Serrano A, et al. Psychiatric comorbidity and plasma levels of 2-acyl-glycerols in outpatient treatment alcohol users. Analysis of gender differences. *Adicciones.* 2016; 29(2):83–96. Epub 2016/10/18. <https://doi.org/10.20882/adicciones.728> PMID: 27749968.
6. Garcia-Valdecasas-Campelo E, Gonzalez-Reimers E, Santolaria-Fernandez F, De La Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sanchez-Perez MJ, et al. Brain atrophy in alcoholics: relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation. *Alcohol Alcohol.* 2007; 42(6):533–8. Epub 2007/09/15. doi: agm065 [pii] <https://doi.org/10.1093/alcalc/agm065> PMID: 17855333.
7. Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Fetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol.* 2009; 44(2):108–14. Epub 2009/01/17. doi: agn105 [pii] <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn105> PMID: 19147799; PubMed Central PMCID: PMC2724862.
8. Luo J, Miller MW. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998; 27(2):157–67. Epub 1998/06/12. doi: S0165017398000095 [pii]. PMID: 9622617.
9. Miller MW, Mooney SM. Chronic exposure to ethanol alters neurotrophin content in the basal forebrain-cortex system in the mature rat: effects on autocrine-paracrine mechanisms. *J Neurobiol.* 2004; 60(4):490–8. Epub 2004/08/13. <https://doi.org/10.1002/neu.20059> PMID: 15307153.
10. Boschen KE, Klintsova AY. Neurotrophins in the Brain: Interaction With Alcohol Exposure During Development. *Vitam Horm.* 2017; 104:197–242. Epub 2017/02/22. doi: S0083-6729(16)30057-7 [pii] <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.008> PMID: 28215296.
11. Castren E. Neurotrophins as mediators of drug effects on mood, addiction, and neuroprotection. *Mol Neurobiol.* 2004; 29(3):289–302. Epub 2004/06/08. doi: MN:29:3:289 [pii] <https://doi.org/10.1385/MN:29:3:289> PMID: 15181240.
12. Bolanos CA, Nestler EJ. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med.* 2004; 5(1):69–83. Epub 2004/03/06. doi: NMM:5:1:069 [pii] <https://doi.org/10.1385/NMM:5:1:069> PMID: 15001814.
13. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci (Lond).* 2006; 110(2):167–73. Epub 2006/01/18. doi: CS20050163 [pii] <https://doi.org/10.1042/CS20050163> PMID: 16411893.
14. Klein R, Nanduri V, Jing SA, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, et al. The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell.* 1991; 66(2):395–403. Epub 1991/07/26. doi: 0092-8674(91)90628-C [pii]. PMID: 1649702; PubMed Central PMCID: PMC2710095.
15. Lanni C, Stanga S, Racchi M, Govoni S. The expanding universe of neurotrophic factors: therapeutic potential in aging and age-associated disorders. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(6):698–717. Epub 2010/04/15. doi: Jirillo 23 [pii]. PMID: 20388080.
16. Dwivedi Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2009; 5:433–49. Epub 2009/09/02. PMID: 19721723; PubMed Central PMCID: PMC2732010.
17. Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. *Psychiatry Investig.* 2010; 7(4):231–5. Epub 2011/01/22. <https://doi.org/10.4306/pi.2010.7.4.231> PMID: 21253405; PubMed Central PMCID: PMC3022308.
18. Villanueva R. Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast.* 2013; 2013:873278. Epub 2013/11/14. <https://doi.org/10.1155/2013/873278> PMID: 24222865; PubMed Central PMCID: PMC3810062.
19. McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci.* 2004; 24(46):10542–52. Epub 2004/11/19. doi: 24/46/10542 [pii] <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3714-04.2004> PMID: 15548669.
20. Heberlein A, Muschler M, Wilhelm J, Frieling H, Lenz B, Groschl M, et al. BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2010; 34(6):1060–4. Epub 2010/06/18. doi: S0278-5846(10)00199-5 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.pnpbpb.2010.05.025> PMID: 20553781.
21. O’Kusky J, Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol.* 2012; 33(3):230–51. Epub 2012/06/20. doi: S0091-3022(12)00028-3 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.yfrme.2012.06.002> PMID: 22710100; PubMed Central PMCID: PMC3677055.
22. Torres-Aleman I. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. *Dev Neurobiol.* 2010; 70(5):384–96. Epub 2010/02/27. <https://doi.org/10.1002/dneu.20778> PMID: 20186710.

23. Malberg JE, Platt B, Rizzo SJ, Ring RH, Lucki I, Schechter LE, et al. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology*. 2007; 32(11):2360–8. Epub 2007/03/08. doi: 1301358 [pii] <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301358> PMID: 17342171.
24. Leggio L, Ferrulli A, Malandrino N, Miceli A, Capristo E, Gasbarrini G, et al. Insulin but not insulin growth factor-1 correlates with craving in currently drinking alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008; 32(3):450–8. Epub 2008/01/25. doi: ACER589 [pii] <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00589.x> PMID: 18215216.
25. Reece AS. Elevated IGF1 in clinical opiate dependence. *Neuro Endocrinol Lett*. 2013; 34(1):18–26. Epub 2013/03/26. doi: NEL340113A03 [pii]. PMID: 23524620.
26. Ilias I, Paparrigopoulos T, Tzavellas E, Karaiskos D, Kontoleon P, Liappas I. IGF-I and IGFBP-3 before and after inpatient alcohol detoxification in alcohol-dependent subjects. *Med Sci Monit*. 2011; 17(10):CR547–51. Epub 2011/10/01. doi: 881979 [pii]. PubMed <https://doi.org/10.12659/MSM.881979> PMID: 21959607; PubMed Central PMCID: PMC3539473.
27. Pardridge WM. Neurotrophins, neuroprotection and the blood-brain barrier. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002; 3(12):1753–7. Epub 2003/01/17. PMID: 12528312.
28. Reitan RM. The relation of the trail making test to organic brain damage. *J Consult Psychol*. 1955; 19(5):393–4. Epub 1955/10/01. PMID: 13263471.
29. Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R. Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *Am J Psychiatry*. 2004; 161(7):1231–7. Epub 2004/07/02. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.7.1231> PMID: 15229056.
30. Hasin D, Samet S, Nunes E, Meydan J, Matseoane K, Waxman R. Diagnosis of comorbid psychiatric disorders in substance users assessed with the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders for DSM-IV. *Am J Psychiatry*. 2006; 163(4):689–96. Epub 2006/04/06. doi: 163/4/689 [pii] <https://doi.org/10.1176/ajp.2006.163.4.689> PMID: 16585445.
31. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, et al. The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry*. 1988; 45(12):1069–77. Epub 1988/12/01. PMID: 2848472.
32. Pedraz M, Martin-Velasco AI, Garcia-Marchena N, Araos P, Serrano A, Romero-Sanchiz P, et al. Plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent cocaine users with high prevalence of substance use disorders: relationship to psychiatric comorbidity. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0118610. Epub 2015/03/04. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118610> PONE-D-14-44568 [pii]. PMID: 25734326; PubMed Central PMCID: PMC4348520.
33. Garcia-Marchena N, Araos PF, Barrios V, Sanchez-Marin L, Chowen JA, Pedraz M, et al. Plasma Chemokines in Patients with Alcohol Use Disorders: Association of CCL11 (Eotaxin-1) with Psychiatric Comorbidity. *Front Psychiatry*. 2016; 7:214. Epub 2017/02/06. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00214> PMID: 28149283; PubMed Central PMCID: PMC5242327.
34. Araos P, Pedraz M, Serrano A, Lucena M, Barrios V, Garcia-Marchena N, et al. Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity. *Addict Biol*. 2015; 20(4):756–72. Epub 2014/05/24. <https://doi.org/10.1111/adb.12156> PMID: 24854157.
35. Yoshida T, Ishikawa M, Niitsu T, Nakazato M, Watanabe H, Shiraishi T, et al. Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. *PLoS One*. 2012; 7(8):e42676. Epub 2012/08/11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042676> PONE-D-12-16776 [pii]. PMID: 22880079; PubMed Central PMCID: PMC3411809.
36. Janak PH, Wolf FW, Heberlein U, Pandey SC, Logrip ML, Ron D. BIG news in alcohol addiction: new findings on growth factor pathways BDNF, insulin, and GDNF. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30(2):214–21. Epub 2006/01/31. doi: ACER26 [pii] <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00026.x> PMID: 16441270.
37. Liu X, Zhang T, He S, Hong B, Chen Z, Peng D, et al. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res*. 2014; 218(1–2):54–60. Epub 2014/05/06. doi: S0165-1781(14)00269-8 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2014.03.042> PMID: 24793757.
38. Yoon SJ, Roh S, Lee H, Lee JY, Lee BH, Kim YK, et al. Possible role of nerve growth factor in the pathogenesis of alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30(6):1060–5. Epub 2006/06/02. doi: ACER120 [pii] <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00120.x> PMID: 16737466.





39. Jockers-Scherubl MC, Bauer A, Kuhn S, Reischies F, Danker-Hopfe H, Schmidt LG, et al. Nerve growth factor in serum is a marker of the stage of alcohol disease. *Neurosci Lett*. 2007; 419(1):78–82. Epub 2007/04/17. doi: S0304-3940(07)00375-8 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.03.051> PMID: 17434673.
40. Rojdmarm S, Brismar K. Decreased IGF-I bioavailability after ethanol abuse in alcoholics: partial restitution after short-term abstinence. *J Endocrinol Invest*. 2001; 24(7):476–82. Epub 2001/08/18. <https://doi.org/10.1007/BF03343879> PMID: 11508780.
41. Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, et al. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007; 31(11):1833–8. Epub 2007/09/14. doi: ACER507 [pii] <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00507.x> PMID: 17850220.
42. Lee BC, Choi IG, Kim YK, Ham BJ, Yang BH, Roh S, et al. Relation between plasma brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in the male patients with alcohol dependence. *Alcohol*. 2009; 43(4):265–9. Epub 2009/06/30. doi: S0741-8329(09)00057-3 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2009.04.003> PMID: 19560628.
43. Huang MC, Chen CH, Liu SC, Ho CJ, Shen WW, Leu SJ. Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol*. 2008; 43(3):241–5. Epub 2008/03/11. doi: agm172 [pii] <https://doi.org/10.1093/alcac/agm172> PMID: 18326550.
44. Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, et al. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology*. 2011; 36(2):228–39. Epub 2010/08/13. doi: S0306-4530(10)00182-4 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.07.013> PMID: 20702043.
45. Ziegenhorn AA, Schulte-Herbruggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, et al. Serum neurotrophins—a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging*. 2007; 28(9):1436–45. Epub 2006/08/02. doi: S0197-4580(06)00224-7 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.011> PMID: 16879899.
46. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol*. 2013; 9(6):366–76. Epub 2013/04/18. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.67> PMID: 23591370; PubMed Central PMCID: PMC4074016.
47. Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Aleman I. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci*. 2012; 49(1):9–12. Epub 2011/08/03. doi: S1044-7431(11)00161-8 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.07.008> PMID: 21807098.
48. Aleman A, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. *Prog Neurobiol*. 2009; 89(3):256–65. Epub 2009/08/12. doi: S0301-0082(09)00112-9 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.07.008> PMID: 19665513.
49. Bernardin F, Maheut-Bosser A, Paille F. Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. *Front Psychiatry*. 2014; 5:78. Epub 2014/08/01. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2014.00078> PMID: 25076914; PubMed Central PMCID: PMC4099962.
50. Toth C, Schmidt AM, Tuor UI, Francis G, Foniok T, Brussee V, et al. Diabetes, leukoencephalopathy and rage. *Neurobiol Dis*. 2006; 23(2):445–61. Epub 2006/07/04. doi: S0969-9961(06)00082-9 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.03.015> PMID: 16815028.
51. Valsecchi AE, Franchi S, Panerai AE, Rossi A, Sacerdote P, Colleoni M. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state, neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *Eur J Pharmacol*. 2011; 650(2–3):694–702. Epub 2010/11/06. doi: S0014-2999(10)01087-3 [pii] <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.060> PMID: 21050844.
52. Moreau R, Jalan R, Arroyo V. Acute-on-Chronic Liver Failure: Recent Concepts. *J Clin Exp Hepatol*. 2015; 5(1):81–5. Epub 2015/05/06. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2014.09.003> S0973-6883(14)00394-6 [pii]. PMID: 25941435; PubMed Central PMCID: PMC4415197.
53. Hughes MS, Shenoy M, Liu L, Colak T, Mehta K, Pasricha PJ. Brain-derived neurotrophic factor is upregulated in rats with chronic pancreatitis and mediates pain behavior. *Pancreas*. 2011; 40(4):551–6. Epub 2011/04/19. <https://doi.org/10.1097/MPA.0b013e318214fb77> 00006676-201105000-00009 [pii]. PMID: 21499209; PubMed Central PMCID: PMC4090218.
54. Modabbernia A, Ashrafi M, Keyvani H, Taslimi S, Poorkaveh A, Merat S, et al. Brain-derived neurotrophic factor predicts physical health in untreated patients with hepatitis C. *Biol Psychiatry*. 2011; 70(5):e31–2. Epub 2011/03/25. doi: S0006-3223(11)00120-X [pii] <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.028> PMID: 21429476.
55. Colao A, Spiezia S, Di Somma C, Pivonello R, Marzullo P, Rota F, et al. Circulating insulin-like growth factor-I levels are correlated with the atherosclerotic profile in healthy subjects independently of age. *J Endocrinol Invest*. 2005; 28(5):440–8. Epub 2005/08/04. doi: 3148 [pii]. PMID: 16075928.
56. Martin RM, Gunnell D, Whitley E, Nicolaides A, Griffin M, Georgiou N, et al. Associations of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, IGF binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 with ultrasound measures of

- atherosclerosis and plaque stability in an older adult population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(4):1331–8. Epub 2008/01/24. doi: [jc.2007-2295](https://doi.org/10.1210/jc.2007-2295) [pii] <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2295> PMID: [18211967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18211967/).
57. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry.* 2010; 11(6):763–73. Epub 2010/03/26. <https://doi.org/10.3109/15622971003611319> PMID: [20334574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20334574/).
 58. Suliman S, Hemmings SM, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci.* 2013; 7:55. Epub 2013/08/03. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00055> PMID: [23908608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23908608/); PubMed Central PMCID: [PMC3725410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3725410/).
 59. Wang Y, Huang M, Jiao JT, Wu YL, Ouyang TH, Huang J, et al. Relationship between concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 and preoperative depression risk, and effect of psychological intervention on outcomes of high-grade glioma patients with preoperative depression in a 2-year prospective study. *Med Oncol.* 2014; 31(5):921. Epub 2014/03/29. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0921-8> PMID: [24668415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24668415/).
 60. Stouthart PJ, Deijen JB, Roffel M, Delemarre-van de Waal HA. Quality of life of growth hormone (GH) deficient young adults during discontinuation and restart of GH therapy. *Psychoneuroendocrinology.* 2003; 28(5):612–26. Epub 2003/05/03. doi: [S0306453002000458](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2003.05.006) [pii]. PMID: [12727130](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12727130/).
 61. Lin F, Suhr J, Diebold S, Heffner KL. Associations between depressive symptoms and memory deficits vary as a function of insulin-like growth factor (IGF-1) levels in healthy older adults. *Psychoneuroendocrinology.* 2014; 42:118–23. Epub 2014/03/19. doi: [S0306-4530\(14\)00020-1](https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.006) [pii] <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.01.006> PMID: [24636508](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24636508/); PubMed Central PMCID: [PMC3996826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3996826/).
 62. Martinowich K, Manji H, Lu B. New insights into BDNF function in depression and anxiety. *Nat Neurosci.* 2007; 10(9):1089–93. Epub 2007/08/30. doi: [nn1971](https://doi.org/10.1038/nn1971) [pii] <https://doi.org/10.1038/nn1971> PMID: [17726474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17726474/).

4.2 Estudio 2:

Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats.

Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats

Daniel Silva-Peña^{1†}, Nuria García-Marchena^{1†}, Francisco Alén¹, Pedro Araos¹, Patricia Rivera², Antonio Vargas¹, María Inmaculada García-Fernández³ , Ana Isabel Martín-Velasco⁴, María Ángeles Villanúa⁴, Estela Castilla-Ortega¹ , Luis Santín⁵, Francisco Javier Pavón¹ , Antonia Serrano¹, Gabriel Rubio⁶, Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,7} & Juan Suárez¹ 

Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), UGC Salud Mental, Universidad de Málaga, Hospital Universitario Regional de Málaga, Spain¹, Departamento de Endocrinología, Fundación Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Spain², Departamento de Fisiología Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, Spain³, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Spain⁴, Departamento de Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento, IBIMA, Facultad de Psicología, Universidad de Málaga, Spain⁵, Departamento de Psiquiatría, Universidad Complutense, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Spain⁶ and Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense, Spain⁷

ABSTRACT

Chronic alcohol consumption is associated with neurocognitive and memory deficits, dramatically affecting plasticity and connectivity, with maximal expression as dementia. Neurotrophic factors may contribute to alcohol-related cognitive decline. For further investigation, a cross-sectional study was performed to evaluate the association of cognitive impairment, by using frontal assessment battery, and memory loss, using memory failures everyday, with the circulating levels of the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin 3 (NT-3) in abstinent subjects with alcohol use disorders (AUDs, $N = 58$, average of 17.9 years of problematic use and 4.3 months of abstinence) compared with healthy control subjects ($N = 22$). This association was also explored in a pre-clinical model of adolescent rats chronically exposed to alcohol up to adulthood (~77 days old) in a three-bottle free-choice (5–10–20 percent), repeated abstinence and relapse paradigm. AUD subjects had low educational level and cognitive impairment associated with teenage consumption and lower circulating levels of BDNF and NT-3. Only BDNF concentration showed a positive correlation with frontal assessment battery in AUD patients. In the ethanol-exposed rats, the plasma levels of BDNF and NT-3 were also decreased, and a negative correlation between hippocampal *Bdnf* mRNA levels and recognition memory was found. The ethanol-exposed rat hippocampus showed a decrease in the mRNA levels of neurotrophic (*Bdnf* and *Ntf-3*) and neurogenic (*Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam1* and *Calb1*) factors, associated to a deactivation of the neurogenic regulator mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase. Results suggest a relevant role of BDNF/extracellular signal-regulated kinase 2 signaling in alcohol-induced cognitive impairment and suggest that early alcohol exposure-derived effects on cognition are associated with neurotrophin signaling deficits.

Keywords alcohol, brain-derived neurotrophic factor, ERK2, hippocampus, memory.

Correspondence to: Dr. Juan Suárez and Prof. Fernando Rodríguez de Fonseca, Laboratorio Medicina Regenerativa (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Avenida Carlos Haya 82, Málaga 29010, Spain. E-mail: juan.suarez@ibima.eu; fernando.rodriguez@ibima.eu

[†]These authors contributed equally to the study.

INTRODUCTION

Alcohol use disorders (AUDs) are the medical diagnosis of pervasive health problems that integrate increased alcohol consumption over time, loss of control over alcohol drinking and persistent alcohol use despite negative consequences. AUDs display a high prevalence in worldwide

population, being a dramatic societal burden on the health system of the developed countries (World Health Organization 2014; Whiteford *et al.*, 2010). AUDs usually induce deleterious effects on cognition and memory with high prevalence of co-morbid mental disorders (e.g. anxiety and depression) and co-morbid organic illnesses (e.g. alcoholic liver disease). Even though alcohol is widely

consumed, only a low percentage of consumers develops alcohol abuse and alcohol dependence (World Health Organization 2014), suggesting the existence of endogenous protective mechanisms in the majority of social drinkers. Specifically, the neurotrophic factors have been identified as central mediators of a homeostatic mechanism that counteracts toxic actions of alcohol in the brain (Logrip *et al.* 2015).

Neurotrophic factors are a family of peptides and small proteins that perform a variety of adaptive functions in the developing and mature brain, particularly the neuronal growth, survival, differentiation, synaptic plasticity and the formation of long-lasting memories and behavioral consolidation (Lu *et al.* 2014). This family, highly expressed in the hippocampus, amygdala and neocortex, includes brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophic 3 (NT-3), neurotrophic 4 and nerve growth factor. BDNF mainly binds to the high-affinity receptor tyrosine kinase tropomyosin-related kinase B (TrkB) and initiates an intracellular downstream signaling, thereby recruiting transcriptional and translational mechanisms, via the mitogen-activated protein kinase (MAPK) extracellular signal-regulated kinase (ERK)1/2 and phosphoinositol 3 kinase pathways (Huang and Reichardt 2003). ERK1/2 downstream effectors are required for the regulation of cell cycle, cell phenotype decisions and postmitotic activities in differentiated cells (Bodart 2010; Roskoski 2012).

Recent studies in clinical models of AUDs provide evidence for the role of neurotrophic factors as molecular modulators of the long-lasting effects on alcohol-induced toxicity, cognitive decline and mental disorders (Ahmadiantehrani *et al.* 2014; Boschen and Klintsova 2017). Chronic alcohol exposure can reduce the circulating concentration of the neurotrophin BDNF, and this effect was more pronounced in AUD patients with alcohol-induced liver and/or pancreas diseases (García-Marchena *et al.* 2017). Despite previous clinical studies suggested a deregulation of BDNF in patients with neuropsychiatric disorders (schizophrenia, depression and anxiety), such association was not found in that study, where cognitive impairment was not evaluated (Bocchio-Chiavetto *et al.* 2010; Suliman *et al.* 2013; Ahmadiantehrani *et al.* 2014; Logrip *et al.* 2015).

Additional studies showed that BDNF expression levels are associated with increased alcohol intake. In humans, *BDNF* gene promoter methylation may contribute to alcohol consumption, as it was increased in alcohol-dependent patients and decreased during alcohol withdrawal (Heberlein *et al.* 2015). As a first mention (Walker *et al.* 1992), high levels of chronic alcohol intake were described to induce a reduction in neurotrophic activity in hippocampal extracts. Recent evidence indicated that an acute (2 g/kg) and low doses (10 g/kg/24 hours) of

alcohol drinking in voluntary or operant self-administration paradigms induced deregulation of BDNF-mediated protective mechanism in dorsal striatum (increased) and cortex (decreased), which persist by 2 weeks' abstinence (Logrip *et al.* 2009, 2015). Interestingly, the activation of TrkB/ERK1/2 signaling pathway in the dorsolateral striatum is necessary for the beneficial actions of BDNF on ethanol drinking (Jeanblanc *et al.* 2013).

BDNF–TrkB function is essential for synaptic plasticity processes required for the formation of long-term learning and memory (Andero *et al.* 2014), an effect modulated by ERK pathway in hippocampal neurons (Tyler *et al.* 2002). In humans, a relationship between *BDNF* (through Met carriers), cognitive processes and hippocampal function has been described (Egan *et al.* 2003). Optimal functioning of the BDNF–TrkB system may be an important protector and susceptibility factor for developing and maintaining poor recovery from impaired memory and altered hippocampal functions across psychiatry disorders.

To explore whether alcohol-induced alterations in growth factors are associated to alcohol-related cognitive impairment, we performed a cross-sectional study to evaluate the association of frontal cognition (frontal assessment battery, FAB) and memory failures (AUD) with the circulating levels of the neurotrophic factors BDNF and NT-3, as well as insulin-like growth factor 2 (IGF-2) in abstinent subjects with AUDs. To further assess this association, we employed an adolescent rat model of bottle free-choice alcohol exposure, abstinence and relapse. We evaluated recognition memory and neurotrophic factors in plasma and hippocampus, as well as BDNF–TrkB signaling through hippocampal ERK1/2 and transcriptional neurogenetic response.

MATERIAL AND METHODS

Human model

Ethics statement

Written informed consent was obtained from each participant after a complete description of the study. All the participants had the opportunity to discuss any questions or issues. The study and protocols for recruitment were approved by the Ethics Committee of the Hospital Regional Universitario de Málaga (PNSD2015/047) in accordance with the 'Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects' adopted in the Declaration of Helsinki by the World Medical Association (64th World Medical Association General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013), Recommendation No. R (97) 5 of the Committee of Ministers to Member States on the Protection of Medical Data (1997) and Spanish

data protection act (*Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos*).

Subjects and recruitment

The present cross-sectional study included 80 participants (Caucasian) divided into two groups: patients with AUDs (AUD group) and healthy control subjects (control group). Fifty-eight AUD patients were recruited from outpatient treatment programs in Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) and from outpatient treatment programs for alcohol addiction in the province of Málaga (Spain) for a period of 18 months (from November 2015 to May 2017). Twenty-two control individuals were recruited from a multi-disciplinary staff working at the Hospital Regional Universitario de Málaga (Málaga, Spain). To be eligible for the study, alcohol-addicted patients had to meet eligibility criteria based on inclusion and exclusion criteria. Inclusion criteria included age ≥ 18 up to 65 years of age, lifetime AUD diagnosis and at least 4 weeks of abstinence. The exclusion criteria of the AUD group were as follows: the presence of infectious diseases, personal history of cancer and pregnancy. To check the alcohol abstinence, a breathalyzer kit was used weekly for estimating blood alcohol content from a breath sample. Subsequently, plasma analyses were conducted to verify alcohol abstinence. The AUD group was under treatment in outpatient programs. The control group had to meet eligibility other criteria based on inclusion and exclusion criteria. Control subjects were matched for sex, age and body mass with AUD patients, and they were required to be ≥ 18 to 65 years of age. The exclusion criteria were personal history of drug abuse, the presence of infectious diseases, personal history of cancer and pregnancy.

Clinical assessments

Patients from outpatient programs for AUD were evaluated according to *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—4th Edition—Text Revision* (DSM-IV-TR) criteria, using the Spanish version of the 'Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Diseases' (Torrens *et al.* 2004). DSM-IV-TR criteria for substance dependence and abuse were used to diagnose substance use disorders and determine the severity of substance use disorders (García-Marchena *et al.* 2017).

Two different tests, which have demonstrated reliability and good psychometric properties, were used as cognitive assessment tools: the Spanish version of the FAB, useful for neuropsychological diagnosis related to frontal lobe dysfunctions (Rodríguez del Álamo *et al.* 2003), and the Spanish version of memory failures everyday (MFE), which is used to evaluate lack of memory in daily life

(Lozoya-Delgado *et al.* 2012). Frontal cognitive deficit was set in < 16 points, and memory deficit was set in > 36 points. As was described previously (Rodríguez del Álamo *et al.* 2003), lower FAB marks than 13 points were considered as 'severe impairment group', FAB marks from 13 to 15 points were included in 'mild cognitive impairment group' and those FAB scores higher than 15 points were considered as 'normal cognitive function'.

Collection of plasma samples

Blood samples were obtained in the morning (9:00–11:00 AM) after fasting for 8–12 hours (previous to the psychiatric interviews), as described previously (García-Marchena *et al.* 2017). Plasma samples were individually characterized, registered and stored at -80°C until further analyses.

Animal model

Ethics statements

Experiments and procedures were conducted under strict adherence to the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and with Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004). All efforts were made to minimize unnecessary suffering. All protocols were approved by the Ethics and Research Committee of Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

Subjects

Animal studies were conducted on 4- to 12-weeks-old male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing ~ 100 g at the beginning of the experiments. Twenty-two rats were individually housed in clear plastic cages in a vivarium under standard controlled conditions: a 12-hour light/dark cycle (lights off at 8:00 PM), ambient temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) and humidity (65 ± 5 percent), at the Animal House Centers of University of Málaga (Spain) and Universidad Complutense Madrid (Spain). Unless otherwise indicated, tap water, alcohol and food (Purina chow) were available *ad libitum* throughout the course of these studies.

Bottle choice paradigm of ethanol exposure, abstinence and relapse

All rats were firstly accustomed to the experimental conditions, including handling, for a period of 1 week (Sánchez-Marín *et al.* 2017). Then, throughout the course of the experiment, half of the rats (ethanol group) had on their cages four bottles (Momeni & Roman 2014): One of them contained water, and the rest contained ethanol at different concentrations (5, 10 and 20 percent). After ethanol habituation (1 week) and acquisition

(3 weeks), rats were exposed to repeated abstinence (1 week) and ethanol relapse (1 week) for four additional weeks. Bottles were daily measured and refilled in order to register the amount of alcohol ingested by each animal. Finally, we generated two experimental groups: control rat group and ethanol rat group ($n = 10$).

Object recognition test

The object recognition test was conducted to assess recognition memory during the first week of abstinence (Ennaceur and Delacour 1988). The number of total animals employed in this work was 22 ($N = 11/\text{group}$). All testing was conducted in a 38×40 -cm opaque plastic rectangular arena with 54-cm-high walls. Before testing, the animals received a session for acclimatization and were allowed to freely explore the arena with no objects inside. One hour after acclimatization phase, rats were individually set into the arena where two identical objects were placed. The animals were allowed to explore the apparatus and the objects for 10 minutes (sample trial). Twenty-four hours later, rats were then returned once more time to the arena and were presented with one familiar object and a novel one. The animals were allowed to explore the apparatus and objects for 5 minutes (retention trial; Pezze *et al.* 2015). The apparatus was evenly illuminated at approximately 70 lx, and the device and the objects were thoroughly clean between animals. All possible location or object combinations were employed to prevent bias due to a preference for a particular object or specific location. Animals were considered to be exploring an object when their snout was directed towards it at a distance of 2 cm or less. The time spent exploring the objects by rats were scored using a video monitor. Discrimination index (d_1) and ratio (d_2) scores were calculated using the following formulas: $d_1 = t_n/t_f$, and $d_2 = (t_n - t_f)/(t_n + t_f)$, where t_n is the amount of time that rats spend exploring the novel object and t_f is the amount of time that rats explore the familiar object.

Sample collection

Previous to sacrifice, all animals were intraperitoneally anesthetized [sodium pentobarbital, 50 mg/kg body weight (BW)] in a room separate from the other experimental animals. Blood samples ($N = 11/\text{group}$) were briefly collected into tubes containing EDTA-2Na (1 mg/ml blood) and centrifuged (1600 *g* for 10 minutes, 4°C). Plasma samples were then frozen and stored at -80°C for hormonal analysis. The animals were sacrificed by decapitation, and their brains were collected, quick frozen and stored at -80°C . These brains were then dissected on dry ice to obtain sections of 1 mm thick by using razor blades and a rat brain slicer matrix. The hippocampus was precisely removed with fine surgical instruments. Hippocampal samples were

weighed and stored at -80°C until they were used for real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot analyses.

Enzyme-linked immunoassay analysis

According to the manufacturer's instructions, plasma levels of BDNF, NT-3 and total IGF-2 were determined using different enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): human BDNF SimpleStep[®] ELISA Kit (#ab212166, Abcam, Cambridge, UK), human NT-3 ELISA Kit (#EHNTF3, ThermoFisher Scientific, Alcobendas, Madrid, Spain), human IGF-II Quantikine ELISA Kit (#DG200, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), rat BDNF ELISA Kit (#ERBDNF, ThermoFisher Scientific, Alcobendas, Madrid, Spain) and rat NT-3 ELISA Kit (#CSB-E04688r-96T, Cusabio, Houston, TX, USA). To perform the ELISA protocols in human samples, we used 50 μL of plasma. To perform the ELISA protocols in rat samples, we used 25 (BDNF) and 50 μL (NT-3) of plasma. As described previously (García-Marchena *et al.* 2017), plasma concentrations of total IGF-1 were estimated by double antibody radioimmunoassay. Plasma fractions were incubated with ^{125}I -IGF-1 at 4°C for 24 hours. The IGF-1 antiserum (UB2-495) was a gift from Drs. Underwood and Van Wisk. In all cases, a calibration curve and internal controls were included in each assay.

RNA isolation and RT-qPCR analysis

We performed real-time PCR (TaqMan, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) as described previously (Rivera *et al.* 2015) using specific sets of primer probes (Table S1). Briefly, hippocampal samples were homogenized on ice, and RNA was extracted following TRIzol[®] method according to the manufacturer's instruction (Gibco BRL Life Technologies, Baltimore, MD, USA). RNA samples were isolated with RNeasy MinElute Cleanup Kit including digestion with DNase I column (Qiagen, Hilden, Germany). After reverse transcript reaction from 1 μg of mRNA, RT-qPCR was performed in a CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and the FAM dye label format for the TaqMan[®] Gene Expression Assays (Thermo Fisher). Melting curve analysis was performed to ensure that only a single product was amplified. Ct values were normalized in relation to *Actb* levels ($N = 11/\text{group}$).

Western blot analysis

Western blotting was performed as described previously (Decara *et al.* 2017). An appropriate combination of primary and secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies was used: phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2 and Thr202/Tyr204) rabbit polyclonal antibody (1:1000

dilution, #9101, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), p44/42 MAPK (ERK1/2) rabbit monoclonal antibody (1:1000 dilution, #4695, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), γ -adapitin mouse monoclonal antibody (1:1000 dilution, #610385, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) and horseradish peroxidase-conjugated antirabbit or antimouse IgG (H + L) secondary antibodies (1:10 000 dilution, Promega, Madison, WI, USA). The protein intensity was quantified with the image processing software IMAGEJ (Rasband, W.S., ImageJ, USA, NIH, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>, 1997–2012). The results were expressed as the protein/ γ -adapitin and phosphorylated/total protein ratios ($N = 6$ /group).

Statistical analysis

All data in tables were expressed as number and percentage of subjects [N (%)] or mean and standard deviation of concentrations [mean (standard deviation)]. The significance of differences in categorical and normal continuous variables was determined using Fisher's exact test and Student's *t*-test, respectively. Neurotrophic factor concentrations and mRNA/protein expression levels were expressed as mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses of behavioral scores, neurotrophic factor concentrations and mRNA/protein expression levels were performed using an analysis of variance (one-way analysis of variance) and *post hoc* Tukey test or Student's *t*-test when possible. Correlation analyses between neurotrophic factor concentrations and behavioral scores were performed by using the Spearman's rank correlation coefficient (*r*). A *P*-value less than 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the GRAPHPAD PRISM version 5.04 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and IBM SPSS STATISTICS version 22 software (IBM, Armonk, NY, USA).

RESULTS

Sample demographics

A total of 80 subjects of both sexes were selected for this study and divided into patients with AUDs ($N = 58$) and controls ($N = 22$). Table 1 shows a socio-demographic description of the sample and the cognitive tests performance in both AUD and control groups. The average participant in the AUD group was a 49.22 years old with a body mass index of 25.86 kg/m². There were significant differences between both groups in education ($P < 0.001$), medication ($P < 0.001$), FAB test score ($t_{78} = 6.739$, $P < 0.001$) and MFE test score ($t_{78} = 2.935$, $P < 0.001$). Thus, AUD group was characterized by more prevalence of medication use, lower education level, lower FAB test score (frontal cognition) and higher MFE test score (memory deficit) relative to control group (please note that higher mark in MFE test indicates poorer performance). A total of 87.94 percent AUD patients were receiving psychiatric medication (55.2 percent selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants, 37.9 percent anxiolytics, 31 percent mood stabilizers and 5.2 percent antipsychotics) during the assessment. In contrast, a total of 36.36 percent control subjects were receiving psychiatric medication (Table 1). FAB scores regarding educational level is not equally distributed in our sample (Table S2). Control group presents higher FAB scores along the different educational levels than AUD group ($t_{74} = 10.58$, $P = 0.002$). Nevertheless, control group presents a stable high mark of FAB through different educational levels ($F_{2, 19} = 0.766$, $P = 0.479$), while the FAB scores in AUD group are strongly altered through the three educational levels ($F_{2, 55} = 4.492$, $P < 0.05$) (Table S2). Specifically, AUD group showed lower FAB scores than control group in educational level 1 ($F_{1, 27} = 2.218$, $P < 0.05$) and in educational level 2

Table 1 Baseline of socio-demographic variables and cognition-related scores.

| Variable | | AUD ($N = 58$) | Control ($N = 22$) | <i>P</i> -value |
|-----------------------|-------------------|------------------|----------------------|---------------------|
| Age [mean (SD)] | Years | 49.22 (8.20) | 47.27 (10.73) | 0.516 ^a |
| BMI [mean (SD)] | kg/m ² | 25.86 (3.81) | 26.51 (3.50) | 0.865 ^a |
| Sex [N (%)] | Female | 10 (17.2) | 3 (13.6) | 0.494 ^b |
| | Male | 48 (82.8) | 19 (86.4) | |
| Education [N (%)] | Elementary | 26 (43.1) | 3 (13.63) | <0.001 ^b |
| | Secondary | 23 (39.65) | 6 (27.27) | |
| | University | 9 (15.51) | 13 (59.09) | |
| Medication [N (%)] | No | 7 (12.06) | 14 (63.63) | <0.001 ^b |
| | Yes | 51 (87.94) | 8 (36.36) | |
| FAB test [mean (SD)] | Points | 14.68 (2.65) | 17.04 (1.17) | <0.001 ^a |
| MFE test [mean (SD)] | Points | 31.29 (17.67) | 13.9 (13.31) | <0.001 ^a |

Higher mark in MFE test indicates worse performance. Abbreviations: AUD = alcohol use disorder; BMI = body mass index; FAB = frontal assessment battery; MFE = memory failures everyday; SD = standard deviation. ^a*P*-value from Student's *t*-test. ^b*P*-value from Fisher's exact test.

($F_{1, 27} = 7.062, P < 0.05$). As expected, FAB scores decreased regarding to lower educational levels in AUD patients (Table S2).

Socio-demographics associated with cognitive and memory deficits in AUD patients

The AUD group ($N = 58$) was subdivided according to FAB and MFE test performance (Table 2). Thirty-four patients (58.6 percent) showed frontal cognitive deficit, 35 patients (60.3 percent) showed memory deficit and 19 patients (32.75 percent) showed both deficits at the same time. Age between FAB groups (yes and no deficit) showed the only significant difference existing ($F_{1, 56} = 0.566, P < 0.05$). There were no significant differences between the presence and absence of cognition and/or memory deficits associated with other socio-demographic variables such as age, body mass index, sex, education, common lifetime mental disorders and starting age of problematic consumption (Table 2). Interestingly, we found that frontal cognitive deficit was found in AUD patients with a lower starting age of consumption (teenage period) compared with those patients without FAB (14.21 ± 2.72 versus $17.29 \pm 5.36; P < 0.01$).

Plasma concentrations of BDNF, NT-3, IGF-1 and IGF-2 in relation with cognition and memory in AUD patients

Total ($N = 80$), AUD ($N = 58$) and control ($N = 22$) samples were analyzed separately by using the Spearman correlation coefficient (r) and P -value for statistical significance (Table 3). In total sample, there was a positive correlation between FAB scores and the plasma concentrations of three different factors: BDNF, NT-3 and IGF-2 ($r = 0.396, P < 0.001; r = 0.351, P < 0.01; r = 0.26, P < 0.05$, respectively). Besides, there was a negative correlation between plasma BDNF levels and MFE scores ($r = -0.357, P < 0.05$). There were no significant correlations between FAB scores and IGF-1 levels and between MFE scores and NT-3, IGF-2 and IGF-1 levels in the total sample (Table 3). In AUD sample, the only significant correlation was detected between FAB scores and BDNF levels ($r = 0.279, P < 0.05$). Finally, no correlations between cognition and memory deficits and neurotrophic factor concentrations were found in control group (Table 3).

Plasma concentrations of BDNF, NT-3 and IGF-2 were strongly decreased in AUD group compared with control group (one-way analysis of variance, *post hoc* Tukey: $F_{3, 137} = 7.167, P < 0.001; F_{3, 137} = 7.22, P < 0.001$; and $F_{3, 137} = 5.542, P < 0.01$, respectively) (Fig. 1a–c). However, when we divided AUD patients into two groups, AUD without deficit and AUD with any deficit (cognition and/or memory deficit), such significances remain in

AUD patients with any deficit, but they disappear when comparing AUD without deficit and control groups. This effect can be observed for BDNF, NT-3 and IGF-2. Interestingly, antidepressant treatment did not produce any effect on plasma BDNF levels in AUD patients ($t_{56} = 1.515, P = 0.138$).

When AUD group was separately examined (without and with any deficit), we found a negative correlation between neurotrophic factors (BDNF and NT-3) and prevalence of any deficit ($r = -0.28, P < 0.05; r = -0.243, P = 0.066$, respectively) (Fig. 1d & e). Regarding point ranges for severe, mild and normal cognitive functions, a positive correlation ($r = 0.276, P < 0.05$) between plasma BDNF levels and FAB test scores in AUD group was observed and represented in Figure 1f. There were no significant correlations between FAB scores and IGF-2 levels in AUD patients.

Decreased expression levels of BDNF and NT-3 in the plasma and hippocampus of alcohol-exposed rats

To further explore the molecular mechanisms implicated in the association between the neurotrophic factors and alcohol-induced memory decline associated with starting age of consumption (teenage period), we performed an adolescent rat model of bottle free-choice alcohol exposure and repeated abstinence and relapse (Fig. 2a). Rat reached an average of total ethanol consumption of ~ 2.2 mg/g BW/24 hours during consecutive 3 weeks (acquisition period) (Fig. S1). After the first abstinence, total ethanol consumption (~ 1.9 mg/g BW/24 hours) was practically unaltered during the first relapse. However, after the second abstinence, total ethanol consumption (~ 1.4 mg/g BW/24 hours) decreased during the second relapse (Fig. S1). The decrease in total ethanol consumption ($F_{1, 20} = 3.15, P < 0.01$) during the second relapse was associated with a reduction in the consumption of 5 percent ethanol and 20 percent ethanol ($F_{1, 20} = 4.34, P < 0.001; F_{1, 20} = 2.29, P < 0.05$) but not in the consumption of 10 percent ethanol (Fig. S1).

We firstly analyzed the circulating levels of neurotrophic plasma in control and ethanol-exposed rats. As in human plasma, BDNF and NT-3 concentrations were decreased in ethanol group compared with control group ($t_{20} = 1.492, P < 0.001; t_{20} = 7.093, P < 0.001$, respectively) (Fig. 2b & c).

Besides, we also analyzed the relative mRNA levels of these neurotrophic factors (*Bdnf* and *Ntf3*) and their specific high-affinity and low-affinity receptors (*TrkB*, *TrkC* and *Lngfr*) in the rat hippocampus (Fig. 2d). *Bdnf* and *Ntf3* gene expression levels were decreased in alcohol group compared with control group ($t_{20} = 3.46, P < 0.01; t_{20} = 2.36, P < 0.05$, respectively), while *TrkB*,

Table 2 Socio-demographic variables associated with cognitive deficits of AUD patients.

| Variable | AUD (N = 58) | | | | | | | | | |
|---|---------------------------------|---------------|--------------------|----------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------|---------|---------|
| | Frontal cognition deficit (FAB) | | | Memory deficit (MFE) | | | Both deficits | | | P-value |
| | No (N = 24) | Yes (N = 34) | P-value | No (N = 23) | Yes (N = 35) | P-value | No (N = 39) | Yes (N = 19) | P-value | |
| Age [mean (SD)] | 45.95 (8.33) | 51.52 (7.39) | <0.05 ^a | 50.78 (7.98) | 48.20 (8.29) | 0.244 ^a | 48.12 (8.10) | 51.47 (8.16) | 0.146 | |
| BMI [mean (SD)] | 25.47 (3.22) | 26.13 (4.20) | 0.525 ^a | 25.65 (3.81) | 25.99 (3.53) | 0.742 ^a | 26.01 (3.45) | 25.55 (4.55) | 0.670 | |
| Sex [N (%)] | 19 (79.2) | 29 (85.3) | 0.395 ^b | 20 (87) | 28 (80) | 0.377 ^b | 32 (82.1) | 16 (84.2) | 0.838 | |
| Education [N (%)] | 5 (20.8) | 5 (14.7) | | 3 (13) | 7 (20) | | 7 (17.9) | 3 (15.8) | | |
| | Elementary | 9 (37.5) | 17 (50) | 12 (52.2) | 14 (40) | 0.658 ^b | 16 (41) | 10 (52.6) | 0.310 | |
| | Secondary | 10 (41.7) | 13 (38.2) | 8 (34.8) | 15 (42.9) | | 15 (38.5) | 8 (42.1) | | |
| | University | 5 (20.8) | 4 (11.8) | 3 (13) | 6 (17.1) | | 8 (20.5) | 1 (5.3) | | |
| Common lifetime mental disorders [N (%)] | 9 (39.1) | 17 (48.6) | 0.743 ^b | 10 (41.7) | 16 (47.1) | 0.738 ^b | 18 (46.2) | 8 (42.1) | 0.816 | |
| | No | 3 (13) | 5 (14.3) | 3 (12.5) | 5 (14.7) | | 11 (28.2) | 4 (21.1) | | |
| | Depression | 6 (26.1) | 9 (25.7) | 8 (33.3) | 7 (20.6) | | 5 (12.8) | 3 (15.8) | | |
| | Anxiety | 5 (21.7) | 4 (11.4) | 3 (12.5) | 6 (17.6) | | 5 (12.8) | 4 (21.1) | | |
| | Others | | | | | | | | | |
| Starting age of problematic consumption [mean (SD)] | 29.87 (11.46) | 31.40 (11.52) | 0.624 ^a | 32.47 (12.55) | 29.71 (10.73) | 0.386 ^a | 30.02 (10.54) | 32.41 (13.4) | 0.477 | |
| Starting age of consumption [mean (SD)] | 17.29 (5.36) | 14.21 (2.72) | <0.01 ^a | 15.75 (5.05) | 15.10 (2.28) | 0.597 ^a | 15.82 (4.93) | 14.88 (2.31) | 0.459 | |

Higher mark in FAB test indicates better performance. Higher mark in MFE test indicates worse performance. Abbreviations: AUD = alcohol use disorder; BMI = body mass index; FAB = frontal assessment battery; MFE = memory failures everyday; SD = standard deviation. ^aP-value from Student's t-test ^bP-value from Fisher's exact test.

Table 3 Correlation between neurotrophic factors and cognition/memory-related scores.

| | FAB | MFE |
|------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Total (N = 80) | | |
| BDNF | $r = 0.396, P = \mathbf{0.0003}$ | $r = -0.357, P = \mathbf{0.011}$ |
| NT-3 | $r = 0.351, P = \mathbf{0.001}$ | $r = -0.17, P = 0.131$ |
| IGF-2 | $r = 0.26, P = \mathbf{0.02}$ | $r = -0.021, P = 0.854$ |
| IGF-1 | $r = 0.174, P = 0.1222$ | $r = -0.052, P = 0.6408$ |
| AUD (N = 58) | | |
| BDNF | $r = 0.276, P = \mathbf{0.036}$ | $r = -0.184, P = 0.166$ |
| NT-3 | $r = -0.201, P = 0.129$ | $r = -0.083, P = 0.538$ |
| IGF-2 | $r = 0.141, P = 0.289$ | $r = 0.171, P = 0.200$ |
| IGF-1 | $r = 0.188, P = 0.156$ | $r = -0.007, P = 0.955$ |
| Control (N = 22) | | |
| BDNF | $r = -0.123, P = 0.585$ | $r = -0.162, P = 0.471$ |
| NT-3 | $r = -0.21, P = 0.925$ | $r = 0.392, P = 0.071$ |
| IGF-2 | $r = -0.159, P = 0.48$ | $r = 0.207, P = 0.354$ |
| IGF-1 | $r = 0.135, P = 0.55$ | $r = -0.085, P = 0.708$ |

Spearman's rank correlation coefficient (r) was used to correlate BDNF, IGF-1, IGF-2, IGFBP-3 and NT-3 levels in plasma with FAB and MFE scores. Higher MFE mark means poorer performance. Statistical significance in bold. Abbreviations: AUD = alcohol use disorder; BDNF = brain-derived neurotrophic factor; FAB = frontal assessment battery; IGF-1/2 = insulin-like growth factor 1/2; IGFBP-3 = insulin-like growth factor-binding protein 3; MFE = memory failures everyday; NT-3 = neurotrophin 3.

TrkC and *Lngfr* mRNA levels did not show any differences (Fig. 2d).

Decreased expression levels of ERK2 phosphorylation and its transcriptional neurogenetic response in the hippocampus of alcohol-exposed rats

We observed that the hippocampus of the alcohol group showed lower phosphorylated protein levels of ERK2 compared with that of control group ($t_{10} = 2.2217, P < 0.05$) (Fig. 3a). However, no differences in the protein levels of ERK1, phosphorylated ERK1 and total ERK2 were found between ethanol and control groups.

Regarding the transcriptional response of ERK2 activation, gene expression levels of several relevant neurogenetic factors were also studied in the rat hippocampus (Fig. 3b). We observed significant decreases in the mRNA levels of the neurogenic factors *Mki67*, *Sox-2*, *Dcx*, *Ncam* and *Calb1* in the ethanol group ($t_{20} = 3.2464, P < 0.01$; $t_{20} = 2.4074, P < 0.05$; $t_{20} = 3.5332, P < 0.001$; $t_{20} = 2.1245, P < 0.05$; and $t_{20} = 2.6205, P < 0.05$, respectively) compared with the control group (Fig. 3b).

Recognition memory in relation to BDNF levels in the plasma and the hippocampus of ethanol-exposed rats

Object recognition test indicated an increase in the discrimination index (t_n/t_f) of the alcohol-exposed rats ($t_{20} = -5.861, P < 0.001$) as a result of a likely

reduction of the familiar exploration time ($t_{20} = 2.67, P < 0.05$) when rats were challenged to a 24-hour retention trial (Fig. 4). Plasma BDNF levels and exploration time of familiar object, but not novel object, after 24 hours (retention trial) correlated positively in ethanol group ($P = 0.017$) but not in controls (Table 4). Besides, mRNA levels of hippocampal *Bdnf* and exploration time of novel object correlated positively in the sample trial of the ethanol group ($P = 0.023$), but no correlation was found in the control group (Table 4). Contrary, hippocampal *Bdnf* levels and novel exploration time correlated negatively in the retention trial (discrimination index) of the ethanol group ($P = 0.023$), but positive correlation was found in the control group ($P = 0.034$). No correlation between hippocampal *Bdnf* levels and familiar exploration time (retention trial) was observed (Table 4). No any correlation was found regarding plasma levels of NT-3 and mRNA expression levels of hippocampal *Ntf3*.

DISCUSSION

In the present study, we evaluated the association between the circulating concentrations of BDNF, NT-3 and IGF-2 concentrations and the frontal cognition and memory deficits in abstinent patients with AUD. In addition, we performed a pre-clinical model of alcohol consumption from adolescence to adulthood to further investigate the mechanisms associated with alcohol-induced neurotrophin deficits and cognitive impairment. Human subjects were recruited from active outpatient treatment programs. AUD patients were clinically characterized through psychiatric interviews based on the DSM-IV-TR (García-Marchena *et al.* 2017). Two additional tests were also carried out as cognitive assessment tools (FAB and MFE), which are useful for neuropsychological diagnosis related to frontal lobe dysfunctions and to evaluate lack of memory in daily life (Rodríguez del Álamo *et al.* 2003; Lozoya-Delgado *et al.* 2012). The main findings in the human model are as follows: (1) Plasma concentrations of BDNF, NT-3 and IGF-2 were specifically lower in the AUD group with any frontal cognitive and/or memory deficit than in the control healthy group; (2) there was a positive correlation between BDNF concentrations and FAB scores (frontal cognition) in AUD patients. Surprisingly, although IGF-2 was clearly reduced in AUD patients, its concentrations did not correlate with cognitive deficits. It should be noted that control group shows higher educational level than AUD group, which is socio-demographically interesting. When analyzing groups separately, higher educational level is related to higher FAB score in AUD group, while in control group, FAB score remains stable through different educational levels. These results suggest that a healthy person without AUD should get a high FAB mark,

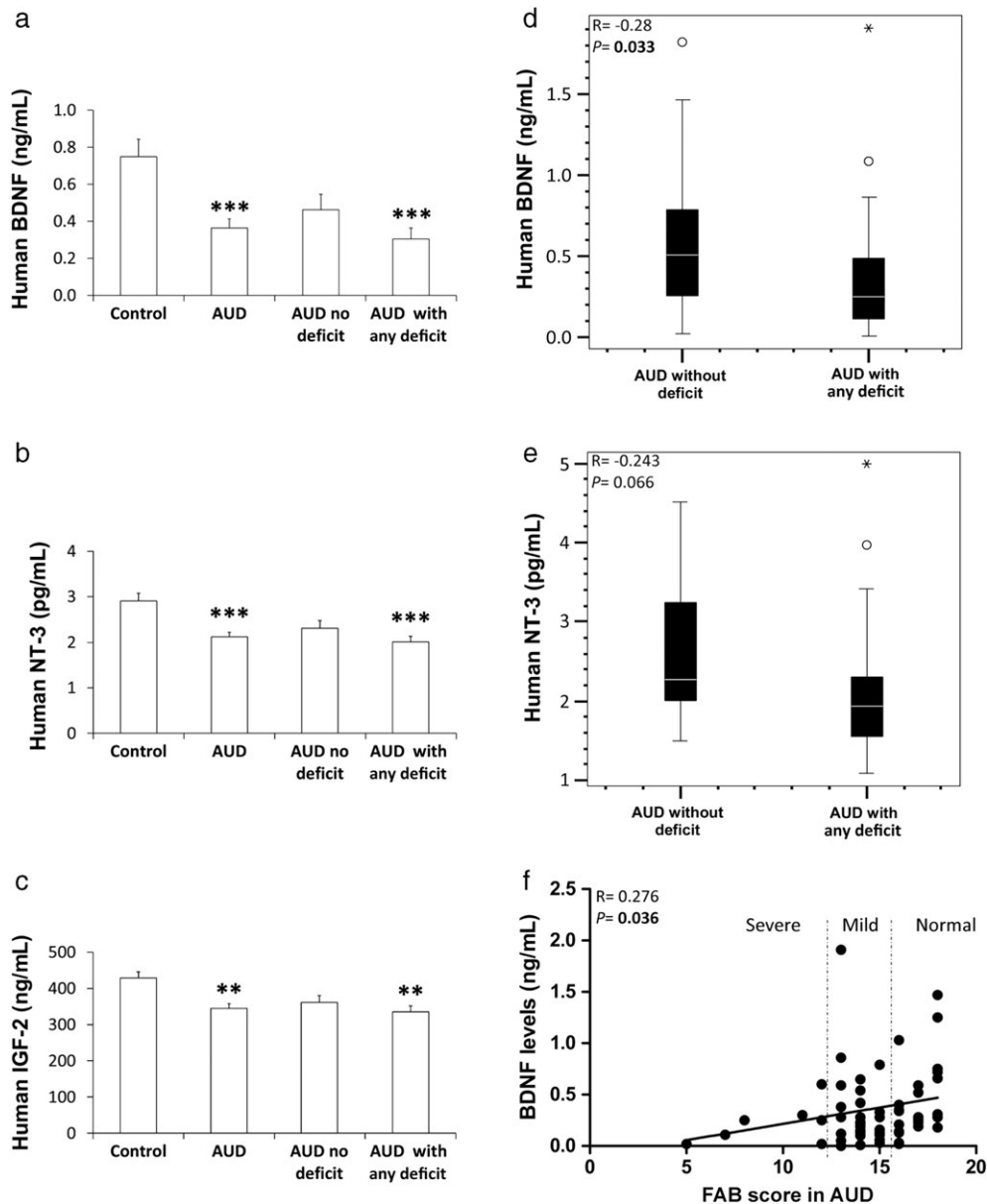


Figure 1 Circulating concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (a), neurotrophin 3 (NT-3) (b) and insulin-like growth factor 2 (IGF-2) (c) in control ($N = 22$) and alcohol use disorder (AUD) subjects ($N = 58$) with ($N = 36$) or without ($N = 22$) frontal cognition and/or memory deficits. Correlation analysis between plasma concentrations of BDNF (d) and NT-3 (e) and AUD patients without and with any deficit. Correlation analysis between plasma concentrations of BDNF and frontal assessment battery (FAB) scores in AUD patients (f). Severe ($N = 7$; < 13 points of FAB scores), mild ($N = 27$; 13–15 points of FAB scores) and normal ($N = 24$; > 15 points of FAB scores) cognitive function were considered. *Post hoc* Tukey test analysis: *** $P < 0.001$ versus control. Pearson correlation coefficient (r) and P -values have been indicated for statistical significance. In correlation graphs, empty circles show atypical outlier values, and asterisks show extreme outlier values

regardless of the educational level. Nevertheless, in AUD group, educational level may play a protective role against dementia.

The relevance of these findings was further explored in a pre-clinical model of bottle free-choice alcohol exposure and repeated abstinence and relapse from adolescence. The analysis indicated that, as it was observed in humans, plasma concentrations of BDNF and NT-3 were reduced. This reduction was associated with a decrease on the mRNA levels of their transcripts in the

hippocampus of rats exposed to alcohol. This finding suggests a relevant negative action of alcohol on these growth factors, whose signaling system was also impaired by alcohol, as revealed by the decrease in the phosphorylated protein levels of ERK2, as well as its transcriptional response to the neurogenic factors *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam* and *Calb1*. Ethanol-exposed rats have cognitive impairments that correlate with alcohol-induced BDNF dysfunction: a positive correlation between plasma BDNF concentrations and familiar

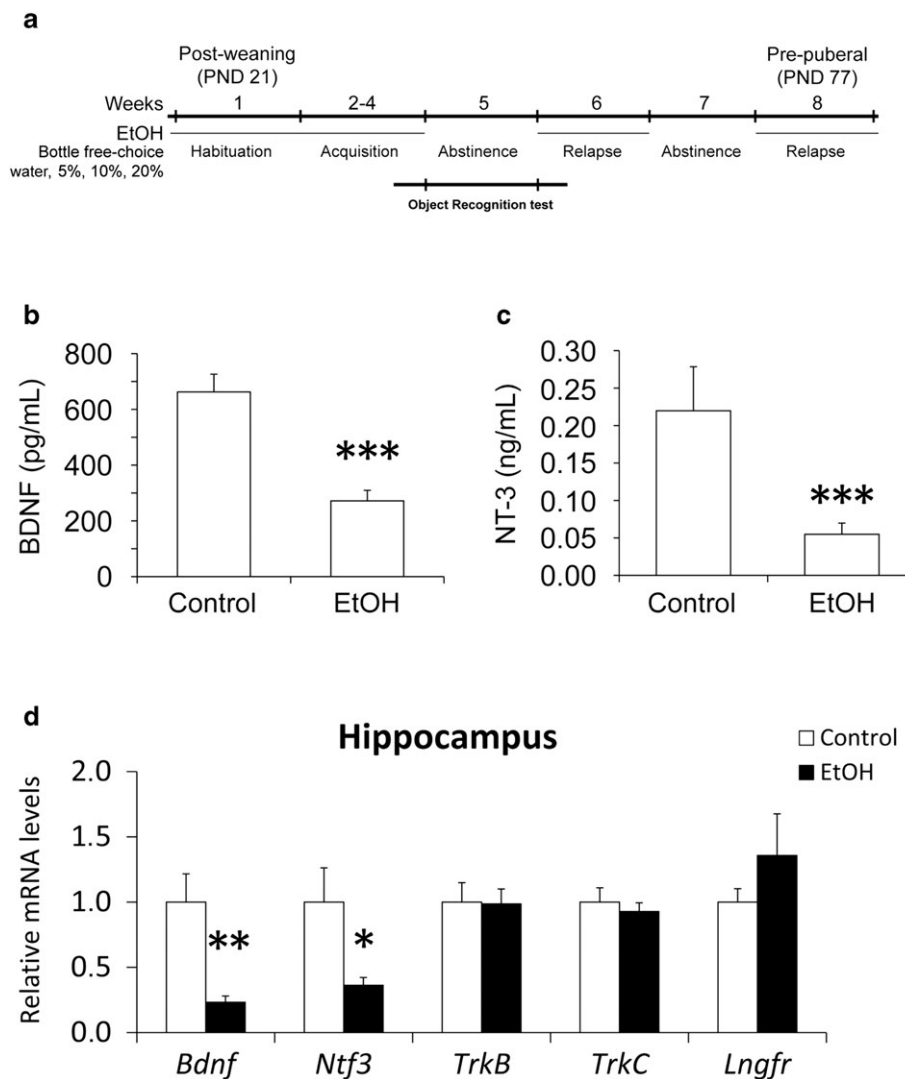


Figure 2 Time line of the experimental design for four-bottle free-choice (water, 5, 10 and 20 percent) paradigm (a) including ethanol acquisition and repeated abstinence and relapse during rat adolescence [from postnatal day (PND)21 to PND77]. Plasma levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (b) and neurotrophin 3 (NT-3) (c) in control and alcohol-exposed rats. mRNA expression levels of *Bdnf*, *Ntf3*, *TrkB*, *TrkC* and *Lngfr* in the hippocampus of control and alcohol-exposed rats (d). Bars represent the mean \pm standard error of the mean ($N = 11$ /group). Student's *t*-test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus control

recognition memory and a negative correlation between hippocampal mRNA levels of *Bdnf* and discrimination index.

Animal and human studies indicated that BDNF is essential for synaptic plasticity and memory processes (Andero *et al.* 2014). BDNF potentiates synaptic transmission in the hippocampal neurons, an effect that is mediated by Trk receptors and regulated via ERK pathway (Levine *et al.* 1995). BDNF/TrkB activation is required for the consolidation of hippocampal-dependent learning followed by delayed stabilization phase, which is specifically required for the maintenance of the memory (Bekinschtein *et al.* 2007). This hypothesis is in agreement with the impaired effects of the specific deletion of *BDNF* gene in the dorsal hippocampus on the declarative

memory evaluated by novel recognition memory and spatial learning by water maze (Tyler *et al.* 2002; Heldt *et al.* 2007). Additionally, unilateral infusion of recombinant BDNF in the mouse hippocampus is able to promote performance in a spatial memory task and has long-lasting effects on emotional behavior (Cirulli *et al.* 2004). Whereas BDNF/TrkB signaling has been associated with alcohol and cocaine use disorders (Heberlein *et al.* 2010; Costa *et al.* 2011; Li and Wolf 2015), as well as various psychiatric disorders including depression, schizophrenia and anxiety (Autry and Monteggia 2012; Kerman 2012; Buckley *et al.* 2007; Andero *et al.* 2014), BDNF dysregulation has not been previously assessed regarding alcohol-induced memory decline (Logrip *et al.* 2015). Our results indicated that circulating levels of

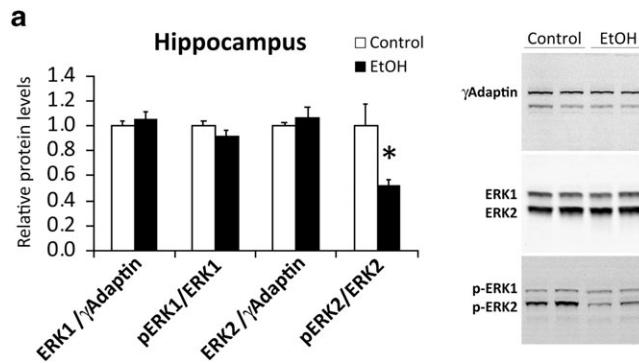


Figure 3 Protein expression levels and representative immunoblots of total extracellular signal-regulated kinase (ERK)1, phospho-ERK1 (p-ERK1), total ERK2 and phospho-ERK2 (p-ERK2) in the hippocampus of control and alcohol-exposed rats (a). mRNA expression levels of *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam* and *Calb* in the hippocampus of control and alcohol-exposed rats (b). Bars represent the mean \pm standard error of the mean ($N = 6-11$ /group). Student's *t*-test: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control

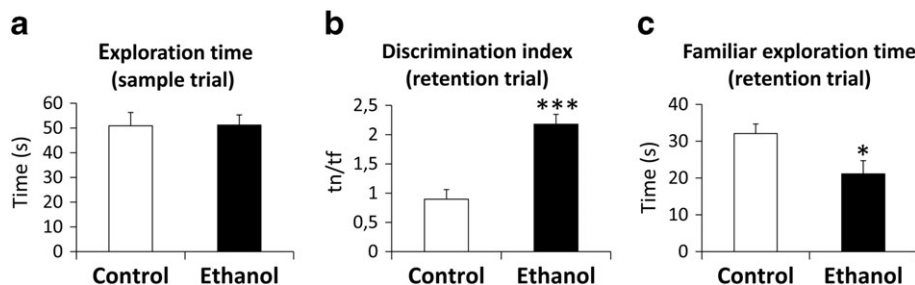
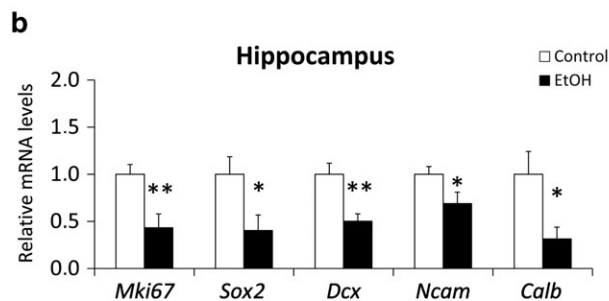


Figure 4 Object recognition test showing sample trial for exploration time (a) and 24-hour retention trial for discrimination index (novel/familiar ratio; b) and familiar exploration time (c). Bars represent the mean \pm standard error of the mean ($N = 11$ /group). Student's *t*-test: * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus control

BDNF were specifically reduced in those abstinent patients with AUD that exhibit any frontal cognition and/or memory deficits. Moreover, memory evaluated by MFE test was negatively associated with the BDNF levels. This association was confirmed after a voluntary ethanol exposure in adolescent rats as we found a positive correlation between plasma BDNF concentrations and familiar recognition memory and a negative correlation between hippocampal *Bdnf* mRNA expression levels and discrimination index. In human, there was evidence that a poorer episodic memory and impaired hippocampal activation were related to a single nucleotide polymorphism in human *BDNF* (Egan *et al.* 2003).

Regarding the literature, a global BDNF decrease has been reported following chronic alcohol exposure to ethanol (Geoffroy and Noble 2017). However, we can find mixed results focusing on the role of BDNF in long-term

adaptive processes affecting drug-seeking behavior in different animal models related to ethanol exposure, withdrawal and relapse that becomes more complicated when we compare juvenile, young adult and adult animals. Several studies indicated that prolonged voluntary intake of alcohol has been associated with a reduction in *Bdnf* gene expression levels in the hippocampus and the medial prefrontal cortex (MacLennan *et al.* 1995; Darq *et al.* 2015). Briones and Woods (2013) reported a 21 percent decrease of BDNF levels in the hippocampus of adolescent rats trained to oral ethanol self-administration for 12 and 7 days of withdrawal. These results contrasted with those about binge-like ethanol exposure in adolescent female rats (Fernandes *et al.* 2018) and those about short (15 days) ethanol exposure and 3–11 days of withdrawal in the hippocampus of adult rats (Alele and Devaud 2013; Schunck *et al.* 2015). In our adolescent rat model,

Table 4 Correlation analysis between recognition memory and BDNF levels in the plasma and the hippocampus of control and ethanol-exposed rats.

| Object recognition test | Plasma BDNF | | Hippocampal Bdnf | |
|--|-----------------------------|--|--|--|
| | Control | Ethanol | Control | Ethanol |
| Novel exploration time (sample trial) | $r = -0.428$ $P = 0.299$ | $r = 0.163$ $P = 0.656$ | $r = 0.607$ $P = 0.166$ | $r = 0.857$ $P = 0.023$ |
| Novel exploration time (retention trial). Discrimination index | $r = -0.16$ $P = 0.703$ | $r = -0.595$ $P = 0.073$ | $r = 0.821$ $P = 0.034$ | $r = -0.84$ $P = 0.023$ |
| Familiar exploration time (retention trial) | $r = -0.261$ $P = 0.536$ | $r = 0.745$ $P = 0.017$ | $r = -0.35$ $P = 0.44$ | $r = 0.071$ $P = 0.90$ |

Spearman's rank correlation coefficient was used to correlate BDNF levels in plasma and *Bdnf* mRNA levels in hippocampus with novel exploration time (sample trial) and novel/familiar exploration time after 24 hours (retention trial). Statistical significance in bold. Abbreviation: BDNF = brain-derived neurotrophic factor.

repeated abstinence and relapse following ethanol acquisition induced decreases in the plasma BDNF concentrations and the hippocampal *Bdnf* mRNA expression levels. Additional limbic brain areas such as the amygdala, the nucleus accumbens and the bed nucleus of the stria terminalis of the genetically selected alcohol-preferring P rats displayed a decrease in the BDNF protein levels (Yan *et al.* 2005; Prakash *et al.* 2008). The direct infusion of BDNF into the dorsolateral striatum was able to reduce operant ethanol self-administration (Jeanblanc *et al.* 2013), an effect that has not been tested in the dorsal hippocampus. Moreover, in agreement with our study, the inhibition of ERK1/2 activity, but not phosphoinositol 3 kinase signaling, blocks the BDNF-mediated reduction of ethanol consumption (Jeanblanc *et al.* 2013). A recent study suggested that early ethanol exposure [postnatal days 4–9, 4 g/kg/day, i.p.] induced long-term changes in the phosphorylated protein levels of ERK1/2 in the prefrontal cortex (decreased) and dorsal hippocampus (increased) of adolescent Sprague–Dawley rats, effects that were not linked to changes in spatial memory (Swart *et al.* 2017). It should be highlighted that ERK signaling is an important developmental signaling pathway in brain (Vithayathil *et al.* 2015). In our rat model, we found a specific reduction in the phosphorylated protein levels of hippocampal ERK2. The loss of BDNF regulation of intracellular ERK2 signaling supports the deactivation of downstream pathways and transcriptional events such as a reduction in the ERK-induced neurogenic response to alcohol exposure (Jeanblanc *et al.* 2013). As expected, we found a downregulation of the mRNA expression levels of *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam* and *Calb1* in the hippocampus of ethanol-exposed rats. These neurogenesis-related factors are implicated in the correct hippocampal functioning like cellular proliferation, maintenance of neural stem cells and neuronal precursor cells, neurite outgrowth and synaptic plasticity (Knoth *et al.* 2010).

The present study also indicated that BDNF remains significantly decreased after long-term abstinence in chronic alcohol exposure in humans (García-Marchena *et al.* 2017). However, the results of clinical studies regarding blood levels of BDNF and alcohol withdrawal severity are relatively limited and inconsistent (Geoffroy and Noble 2017). These discrepancies or 'dynamic alterations' are difficult to interpret and raise the question of the reliability of BDNF to be a good biomarker for psychiatric diseases. Several studies reported no difference in baseline serum BDNF levels between alcoholic patients and controls (Geoffroy and Noble 2017), whereas other authors observed a modest increase in BDNF levels in early alcohol withdrawal (Reynolds *et al.* 2015) or a decrease in 2-week alcohol withdrawal patients (Köhler *et al.* 2013). Several authors explain these discrepancies in the use of different medications such as antidepressants and benzodiazepines (Heberlein *et al.* 2010), and others showed contradictory results when using plasma or serum in patients with alcohol dependence (Zanardini *et al.* 2011). In agreement with our study, a previous study reported that alcohol-dependent patients hospitalized for more than 30 days in order to diminish the effects of alcohol intoxication or withdrawal showed a decrease in plasma BDNF levels (Joe *et al.* 2007). Interestingly, these authors also reported that none of the subjects were under psychoactive medications at the moment of the study. Contrary, another study by Costa *et al.* (2011) indicated no significant changes of serum BDNF levels in alcohol-dependent participants admitted to the hospital for alcohol detoxification, as well as increased BDNF levels in abstinent and non-abstinent patients at the first 6-month follow-up. These results appear to be contradictory because drinking and not drinking subjects had increasing BDNF levels. In other studies, withdrawal times were no longer than 14 days, and average years of problematic consumption and relapses were not evaluated (Heberlein *et al.* 2010; Köhler *et al.* 2013; Reynolds

et al. 2015; Huang *et al.* 2008). Besides, none of these studies controlled educational level, as social factors have demonstrated to be important in neurotrophic plasma levels (Murinová *et al.* 2017).

In conclusion, these results suggest that BDNF is closely associated with alcohol-induced cognitive impairments in human and rats. This association in alcohol-exposed rats can be regulated by BDNF/ERK2 signaling and its neurogenic response in the hippocampus. Thus, monitoring BDNF and cognitive impairment emerge as a clinically relevant procedure to be considered for both patient stratification and therapeutic interventions aimed to increase the circulating levels of this growth factor. Although we lack effective compounds (including recombinant BDNF) approved for clinical use, the specific activation of BDNF/TrkB/ERK2 signaling might be achieved by other therapeutic strategies such as physical exercise, psychotherapy and perhaps pharmacological procedures. They have to be considered as strategies to prevent and treat the cognition/memory decline and hippocampal damage underlying to alcohol addiction.

Acknowledgements

The authors thank the participants and the psychiatry research support staff for their generosity and interest. The present work has been supported by RETICS Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and European Regional Development Funds—European Union (ERDF-EU) (RD16/0017/0001); Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (J.S.: PND2015/047; A.S.: PND2017/043); and ISCIII, MINECO, ERDF-EU (PI16/01374, PI16/01698 and PI16/01953). J.S., A.S. and F.J. P. hold ‘Miguel Servet’ research contracts funded by ISCIII, ERDF-EU (CP117/00024, CP14/00173 and CP14/00212, respectively). P.R. holds a ‘Sara Borrel’ research contract funded by ISCIII, ERDF-EU (CD16/00067).

Authors Contribution

FRDF and JS contributed in the conception and design and review and editing of the study; DS-P, NG-M, FA, PA and AV in the data acquisition; DS-P, NG-M, PR, MIG-F, MAV, FJP and AS in the data analysis and interpretation; DS-P and JS in the draft writing; and all authors in the final approval of the manuscript.

Disclosure/Conflict of Interest

The authors declare that no competing interests exist.

References

- Ahmadiantehrani S, Warnault V, Legastelois R, Ron D (2014) From signaling pathways to behavior: the light and dark sides of alcohol. *Neurobiology of Alcohol Dependence* 155:–171. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405941-2.00009-2>.
- Alele PE, Devaud LL (2013) Expression of cFos and brain-derived neurotrophic factor in cortex and hippocampus of ethanol-withdrawn male and female rats. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics* 4:265–274. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.119712>.
- Andero R, Choi DC, Ressler KJ (2014) BDNF–TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 122:169–192. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420170-5.00006-4>.
- Autry AE, Monteggia LM (2012) Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological Reviews* 64:238–258. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005108>.
- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilacqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53:261–277.
- Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, Giovannini C, Rillosi L, Ventriglia M, Riva MA, Gennarelli M (2010) Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *The World Journal of Biological Psychiatry* 11:763–773. <https://doi.org/10.3109/15622971003611319>.
- Bodart JF (2010) Extracellular-regulated kinase–mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *Journal of Cellular Biochemistry* 109:850–857. <https://doi.org/10.1002/jcb.22477>.
- Boschen KE, Klintsova AY (2017) Neurotrophins in the brain: interaction with alcohol exposure during development. *Vitamins and Hormones* 104:197–242. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.008>.
- Brones TL, Woods J (2013) Chronic binge-like alcohol consumption in adolescence causes depression-like symptoms possibly mediated by the effects of BDNF on neurogenesis. *Neuroscience* 254:324–334. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.031>.
- Buckley PE, Pillai A, Evans D, Stirewalt E, Mahadik S (2007) Brain derived neurotrophic factor in first-episode psychosis. *Schizophrenia Research* 91:1–5.
- Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E (2004) Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus* 14:802–807.
- Costa MA, Girard M, Dalmay F, Malauzat D (2011) Brain-derived neurotrophic factor serum levels in alcohol-dependent subjects 6 months after alcohol withdrawal. *Alcoholism. Clinical and Experimental Research* 35:1966–1973. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01548.x>.
- Darcq E, Warnault V, Phamluong K, Besserer GM, Liu F, Ron D (2015) MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. *Molecular Psychiatry* 20:1219–1231. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.120>.
- Decara J, Rivera P, Arrabal S, Vargas A, Serrano A, Pavón FJ, Dieguez C, Nogueiras R, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J (2017) Cooperative role of the glucagon-like peptide-1 receptor and β 3-adrenergic-mediated signalling on fat mass

- reduction through the downregulation of PKA/AKT/AMPK signalling in the adipose tissue and muscle of rats. *Acta Physiologica (Oxford, England)* Nov 28. <https://doi.org/10.1111/apha.13008>.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003) The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112:257–269.
- Ennaceur A, Delacour J (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: behavioral data. *Behavioural Brain Research* 31:47–59.
- Fernandes LMP, Cartágenes SC, Barros MA, Carvalheiro TCVS, Castro NCF, Schamne MG, Lima RR, Prediger RD, Monteiro MC, Fontes-Júnior EA, Cunha RA, Maia CSF (2018) Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. *Behavioural Brain Research* 350:99–108. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.007>.
- García-Marchena N, Silva-Peña D, Martín-Velasco AI, Villanúa MÁ, Araos P, Pedraz M, Maza-Quiroga R, Romero-Sanchiz P, Rubio G, Castilla-Ortega E, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Serrano A, Pavón FJ (2017) Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. *PLoS One* 12:e0187634. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187634>.
- Geoffroy H, Noble F (2017) BDNF during withdrawal. *Vitamins and Hormones* 104:475–496. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2016.10.009>.
- Heberlein A, Büscher P, Schuster R, Kleimann A, Lichtinghagen R, Rhein M, Kornhuber J, Bleich S, Frieling H, Hillemacher T (2015) Do changes in the BDNF promoter methylation indicate the risk of alcohol relapse? *European Neuropsychopharmacology* 25:1892–1897. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.08.018>.
- Heberlein A, Muschler M, Wilhelm J, Frieling H, Lenz B, Gröschl M, Kornhuber J, Bleich S, Hillemacher T (2010) BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 34:1060–1064. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.05.025>.
- Heldt S, Stanek L, Chhatwal J, Ressler K (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry* 12:656–670. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001957>.
- Huang EJ, Reichardt LF (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* 72:609–642.
- Huang MC, Chen CH, Chen CH, Liu SC, Ho CJ, Shen WW, Leu SJ (2008) Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal. *Alcohol and Alcoholism* 43:241–245. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn172>.
- Jeanblanc J, Logrip ML, Janak PH, Ron D (2013) BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis. *The European Journal of Neuroscience* 37:607–612. <https://doi.org/10.1111/ejn.12067>.
- Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, Lee HJ, Kim DJ (2007) Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 31:1833–1838.
- Kerman IA (2012) New insights into BDNF signaling: relevance to major depression and antidepressant action. *The American Journal of Psychiatry* 169:1137–1140. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2012.12081053>.
- Knöth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G (2010) Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5:e8809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008809>.
- Köhler S, Klimke S, Hellweg R, Lang UE (2013) Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations change after alcohol withdrawal: preliminary data of a case-control comparison. *European Addiction Research* 19:98–104. <https://doi.org/10.1159/000342334>.
- Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1995) Brain-derived neurotrophic factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:8074–8077.
- Li X, Wolf ME (2015) Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. *Behavioural Brain Research* 0:240–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.018>.
- Logrip ML, Barak S, Warnault V, Ron D (2015) Corticostriatal BDNF and alcohol addiction. *Brain Research* 1628:60–67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.03.025>.
- Logrip ML, Janak PH, Ron D (2009) Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *Journal of Neurochemistry* 109:1459–1468. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06073.x>.
- Lozoya-Delgado P, Ruiz-Sánchez de León JM, Pedrero-Pérez EJ (2012) Validación de un cuestionario de quejas cognitivas para adultos jóvenes: relación entre las quejas subjetivas de memoria, la sintomatología prefrontal y el estrés percibido. *Revista de Neurología* 54:137–150.
- Lu B, Nagappan G, Lu Y (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handbook of Experimental Pharmacology* 220:223–250. https://doi.org/10.1007/978-3-642-45106-5_9.
- MacLennan AJ, Lee N, Walker DW (1995) Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 197:105–108.
- Momeni S, Roman E (2014) Subgroup-dependent effects of voluntary alcohol intake on behavioral profiles in outbred Wistar rats. *Behavioural Brain Research* 275:288–296. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.058>.
- Murínová J, Hlaváčová N, Chmelová M, Riečanský I (2017) The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: a systematic review. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11:101. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00101>.
- Pezze MA, Marshall HJ, Fone KC, Cassaday HJ (2015) Dopamine D1 receptor stimulation modulates the formation and retrieval of novel object recognition memory: role of the prelimbic cortex. *European Neuropsychopharmacology* 25:2145–2156. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.07.018>.
- Prakash A, Zhang H, Pandey SC (2008) Innate differences in the expression of brain-derived neurotrophic factor in the regions within the extended amygdala between alcohol preferring and nonpreferring rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 32:909–920. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00650.x>.
- Reynolds PM, Mueller SW, MacLaren R (2015) A comparison of dexmedetomidine and placebo on the plasma concentrations of NGF, BDNF, GDNF, and epinephrine during severe alcohol withdrawal. *Alcohol* 49:15–19. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.11.006>.

- Rivera P, Bindila L, Pastor A, Pérez-Martín M, Pavón FJ, Serrano A, de la Torre R, Lutz B, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J (2015) Pharmacological blockade of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) alters neural proliferation, apoptosis and gliosis in the rat hippocampus, hypothalamus and striatum in a negative energy context. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9:98. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00098>.
- Rodríguez del Alamo A, Catalán Alonso MJ, Carrasco ML (2003) FAB: a preliminar Spanish application of the frontal assessment battery to 11 groups of patients. *Revista de Neurologia* 36:605–608.
- Roskoski R Jr (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66:105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.
- Sanchez-Marin L, Pavon FJ, Decara J, Suarez J, Gavito A, Castilla-Ortega E, Rodriguez de Fonseca F, Serrano A (2017) Effects of intermittent alcohol exposure on emotion and cognition: a potential role for the endogenous cannabinoid system and neuroinflammation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 11:15. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00015>.
- Schunck RV, Torres IL, Laste G, de Souza A, Macedo IC, Valle MT, Salomón JL, Moreira S, Kuo J, Arbo MD, Dallegre E, Leal MB (2015) Protracted alcohol abstinence induces analgesia in rats: possible relationships with BDNF and interleukin-10. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 135:64–69. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.05.011>.
- Suliman S, Hemmings SM, Seedat S (2013) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 7:55. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00055>.
- Swart PC, Currin CB, Russell VA, Dimatellis JJ (2017) Early ethanol exposure and vinpocetine treatment alter learning- and memory-related proteins in the rat hippocampus and prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience Research* 95:1204–1215. <https://doi.org/10.1002/jnr.23894>.
- Torrens M, Serrano D, Astals M, Perez-Dominguez G, Martin-Santos R (2004) Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the psychiatric research interview for substance and mental disorders and the structured clinical interview for DSM-IV. *The American Journal of Psychiatry* 161:1231–1237. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.7.1231>.
- Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD (2002) From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, NY)* 9:224–237. <https://doi.org/10.1101/lm.51202>.
- Vithayathil J, Pucilowska J, Goodnough LH, Atit RP, Landreth GE (2015) Dentate gyrus development requires ERK activity to maintain progenitor population and MAPK pathway feedback regulation. *The Journal of Neuroscience* 35:6836–6848. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4196-14.2015>.
- Walker DW, Lee N, Heaton MB, King MA, Hunter BE (1992) Chronic ethanol consumption reduces the neurotrophic activity in rat hippocampus. *Neuroscience Letters* 147:77–80.
- Whiteford HA, Degenhardt L, Rehm J, Baxter AJ, Ferrari AJ, Erskine HE, Charlson FJ, Norman RE, Flaxman AD, Johns N, Burstein R, Murray CJ, Vos T (2010) Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2013:1575–1586. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61611-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61611-6).
- World Health Organization (2014). Global status report on alcohol and health.
- Yan QS, Feng MJ, Yan SE (2005) Different expression of brain-derived neurotrophic factor in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) and -nonpreferring (NP) rats. *Brain Research* 1035:215–218.
- Zanardini R, Fontana A, Pagano R, Mazzaro E, Bergamasco F, Romagnosi G, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L (2011 Aug) Alterations of brain-derived neurotrophic factor serum levels in patients with alcohol dependence. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 35:1529–1533. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01489.x>.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. List of primers used to perform PCR analysis from TaqMan® Gene Expression Assays (ThermoFisher).

Table S2. FAB scores regarding educational levels in control and AUD subjects¹.

Figure S1. Daily average consumption (mg EtOH/g BW/24 h) of ethanol during the phases of acquisition (3 weeks) and repeated relapses after abstinence in a bottle free-choice (5%, 10%, 20%) paradigm. Bars represent the mean ± SEM (N = 11/group). Post-hoc Tukey test analysis: */**/****p* < 0.05/0.01/0.001 vs control.

4.3 Estudio 3:

Oleylethanolamide modulates BDNF-ERK signaling and neurogenesis in the hippocampus of rats exposed to δ 9-THC and ethanol binge drinking at adolescence.



Oleylethanolamide Modulates BDNF-ERK Signaling and Neurogenesis in the Hippocampi of Rats Exposed to Δ^9 -THC and Ethanol Binge Drinking During Adolescence

Daniel Silva-Peña¹, Patricia Rivera², Francisco Alén³, Antonio Vargas¹, Leticia Rubio⁴, Nuria García-Marchena¹, Francisco Javier Pavón¹, Antonia Serrano¹, Fernando Rodríguez de Fonseca^{1,3*} and Juan Suárez^{1*}

¹ Instituto de Investigación Biomédica de Málaga, U.G.C. de Salud Mental, Hospital Regional Universitario de Málaga, Málaga, Spain, ² Department of Endocrinology, Fundación Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain, ³ Departamento de Psicobiología, Universidad Complutense Madrid, Pozuelo de Alarcón, Spain, ⁴ Departamento de Anatomía y Medicina Legal, Universidad de Málaga, Málaga, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Eric Murillo-Rodríguez,
Anahuac Mayab University, Mexico

Reviewed by:

Ricardo Marcos Pautassi,
National Scientific and Technological
Research Council (CONICET),
Argentina
Olga Valverde,
Pompeu Fabra University, Spain

*Correspondence:

Fernando Rodríguez de Fonseca
fernando.rodriguez@ibima.eu
Juan Suárez
juan.suarez@ibima.eu

Received: 11 December 2018

Accepted: 01 April 2019

Published: 24 April 2019

Citation:

Silva-Peña D, Rivera P, Alén F,
Vargas A, Rubio L,
García-Marchena N, Pavón FJ,
Serrano A, Rodríguez de Fonseca F
and Suárez J (2019)
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. 12:96.
doi: 10.3389/fnmol.2019.00096

Oleylethanolamide is an endogenous NAE that modulates ethanol-seeking behavior and ethanol-induced neuroinflammation. In the present study we further analyze the role of OEA in hippocampal neurogenesis, BDNF-ERK signaling, and spatial memory that are affected by alcohol. Additionally, we addressed the effects of OEA on the association of alcohol and cannabis, a frequent combination in human alcohol addicts, and whose long-term effects are far from being understood. To this end, OEA (10 mg/kg/day, i.p.) was pharmacologically administered for 5 days/week in a preclinical model of adolescent rats with binge-like consumption (1 day/week) of ethanol (3 g/kg, i.g.) combined or not with acute administrations of Δ^9 -THC (5 mg/kg, i.p.) for 5 weeks. OEA restored ethanol/THC-related decreases in both short-term spatial memory (spontaneous alternation by Y-maze) and circulating levels of BDNF, reduced cell proliferation (*Mki67* and IdU+ cells) and maturation (*Dcx*, *Calb1*), and improved cell survival (*Casp3* and BrdU+ cells) in the dorsal hippocampus. Interestingly, OEA alone or combined with THC also decreased the mRNA levels of neurotrophic factors (*Bdnf*, *Ntf3*) and the NT3 receptor *TrkC*, but increased the BDNF receptor *TrkB* in the hippocampus of ethanol-exposed rats. These effects were likely associated with a OEA-specific phosphorylation of AKT and ERK1, key signaling regulators of cell proliferation and survival. These results suggest a regulatory role of OEA in short-term spatial memory and hippocampal neurogenesis through BDNF/AKT/ERK1 signaling in response to acute THC in an alcoholic context during adolescence.

Keywords: alcohol, brain-derived neurotrophic factor, ERK, hippocampus, memory, oleylethanolamide

INTRODUCTION

The excessive consumption of alcohol is associated with alterations in brain physiology, structure and function. The effects of alcohol are concentration-dependent and the patterns of excessive alcohol intake, such as binge drinking, are becoming predominant, especially in young drinkers. Alcohol binge drinking is defined as the pattern of consumption that increases the blood alcohol

concentration above 80 mg/dL, which occurs after a consumption of about 56–70 g of pure alcohol in ≤ 2 h (NIAAA, 2004; Pilatti et al., 2017). At early ages, exposure to alcohol binges increases subsequent alcohol intake during adolescence, but not adulthood (Fabio et al., 2014). Alcohol intake initiation in binge episodes may induce long-lasting consequences in the adult brain and increases lifetime risks of developing adult psychopathology, particularly alcohol use disorders (AUD) (Crews et al., 2016). Alcohol-induced neurodegeneration is associated with changes in neuronal processes such as apoptosis and neuronal proliferation and maturation (Nixon and Crews, 2004).

A relevant issue when considering the impact of alcohol abuse on brain development and function is its association with the consumption of additional psychoactive drugs, mainly cannabis. It is well-known that Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), the primary psychoactive component of cannabis, has an impact on brain development and function, and short term-memory deficits induced by THC have been well documented (Iversen, 2003). A potential brain area where alcohol and cannabis might converge is the hippocampus, a place notably affected by acute and chronic alcohol exposure. The mammalian hippocampus is a brain region strongly related to memory processes and adult neurogenesis (Moreno-Jiménez et al., 2019). It contains a high density of cannabinoid CB1 receptors (Rivera et al., 2014), the main target of THC, suggesting that this area is an important locus for cannabinoid effects on learning and memory (Varvel and Lichtman, 2005). Both acute and chronic exposure to cannabis are associated with dose-related cognitive impairments, affecting different cognitive areas, especially attention, working memory, verbal learning, and memory functions (Zanettini et al., 2011) and humans (Solowij and Battisti, 2008).

Several endogenous mechanisms capable of counteracting alcohol-induced damage have been identified. Among them, OEA is a promising lipid transmitter capable of counteracting both alcohol-induced neuroinflammation (Antón et al., 2017) and alcohol seeking behavior (Bilbao et al., 2016). OEA belongs to a NAE family involved in the regulation of multiple physiological functions such as feeding behavior, addiction, and cancer cell proliferation (Sihag and Jones, 2018; Zhao et al., 2018). The roles of OEA are mediated primarily by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (Orío et al., 2013) and other targets such as the transient receptor potential vanilloid type-1 or the orphan G protein-coupled receptors 119 and 55 (Antón et al., 2017). Recent preclinical evidence indicated that OEA is involved in homeostatic protective mechanisms in response to alcohol abuse (Bilbao et al., 2016). OEA is released after alcohol administration in rodents, and its exogenous administration regulates alcohol

relapse and reduces several withdrawal symptoms of alcohol (Bilbao et al., 2016; Antón et al., 2017). A recent study of our group described that plasma concentrations of OEA are increased in abstinent patients diagnosed with AUD, suggesting that OEA may act as a potential biomarker for predicting length of alcohol abstinence (García-Marchena et al., 2017a). Neuroprotective and anti-inflammatory profiles of OEA are not restricted to alcohol, but also demonstrated in animal models of neurological disorders, such as Parkinson's disease or brain ischemia (Zhou et al., 2012; Gonzalez-Aparicio et al., 2014).

Neurotrophic factors, specially the BDNF, constitute another endogenous mechanism involved in alcohol effects (Silva-Peña et al., 2018). Neurotrophic factors are a family of peptides and small proteins involved in a variety of adaptive functions in the developing and mature brain, particularly neuronal growth, differentiation, survival, synaptic plasticity, and the formation of long-lasting memories and behavioral consolidation (Lu et al., 2014). BDNF mainly binds to the high-affinity receptor tyrosine kinase tropomyosin-related kinase B (TrkB) and initiates an intracellular downstream signaling, thereby recruiting transcriptional and translational mechanisms via the MAP kinase ERK1/2 and phosphoinositol 3-kinase (PI3K) pathways (Huang and Reichardt, 2003). BDNF-TrkB signaling system and ERK downstream effectors on transcription are highly implicated in cell cycle, cell phenotype decisions, postmitotic activities, and synaptic plasticity (Bodart, 2010; Roskoski, 2012). These processes are highly involved in the formation of learning and memory in the hippocampus (Andero et al., 2014). Optimal functioning of the BDNF-TrkB-ERK signaling may be a susceptibility factor for developing and maintaining poor recovery from impaired memory and altered hippocampal functions. Recent clinical studies have shown that circulating levels of BDNF are decreased in abstinent patients diagnosed with AUD (García-Marchena et al., 2017b). Moreover, reduced BDNF levels in the plasma of alcohol-dependent patients correlated with severe scores of cognition deficits, whereas chronic consumption and reinstatement of ethanol in adolescent rats was associated with lower plasma levels of BDNF, as well as with decreases in *Bdnf* mRNA levels, phosphorylated ERK2 levels and neurogenic responses (*Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam1*, and *Calb1*) in the hippocampus (Silva-Peña et al., 2018). These neurogenesis-related factors are implicated in the correct hippocampal functioning like cellular proliferation, maintenance of neural stem cells and neuronal precursor cells, and neurite outgrowth including humans (Knoth et al., 2010; Moreno-Jiménez et al., 2019). Besides, a negative correlation between hippocampal *Bdnf* mRNA levels and recognition memory was found under an alcoholic context (Silva-Peña et al., 2018).

Thus, here the main hypothesis under test was that OEA regulates BDNF signaling in a model of adolescent rats exposed to ethanol and THC. The homeostatic role for OEA has not been still explored in hippocampal functioning related to neurogenesis, BDNF-ERK signaling and memory that become notably altered by alcohol and partially affected by cannabinoid activation. Using a multi-disciplinary approach and a pharmacological administration of OEA (10 mg/kg/day, i.p.) for 5 days/week in a rat model of binge-like consumption

Abbreviations: 9-THC, delta-9-tetrahydrocannabinol or dronabinol; AKT (pAKT), protein kinase B (phosphorylated); BDNF/*Bdnf*, brain-derived neurotrophic factor; BrdU, 5-bromo-2'-deoxyuridine; Calb1, calbindin; Casp3, caspase 3; *dcx*, doublecortin; ERK1/2 (pERK1/2), extracellular signal-regulated kinases 1/2 or MAP kinases 1/2 (phosphorylated); gcl, granular cell layer of dentate gyrus; IdU, 5-iodo-2'-deoxyuridine; Lngfr, low-affinity nerve growth factor receptor; *Mki67*, antigen KI-67; ml, molecular layer of dentate gyrus; NCAM, neural cell adhesion molecule; Ntf3, neurotrophin-3; OEA, oleylethanolamide; PCL, polymorphic cell layer of dentate gyrus; SGZ, subgranular zone of the dentate gyrus; *Sox2*, sex determining region Y (SRY)-box 2; Str, striatum; TrkB, tropomyosin receptor kinase B; TrkC, tropomyosin receptor kinase C.

(1 day/week) of ethanol (3 g/kg, i.g.) together with acute administrations of Δ^9 -THC (5 mg/kg, i.p.) for 5 weeks during adolescence, we explored the effects of OEA treatment on (1) spatial memory-like behavior, (2) mRNA expression of components of the neurotrophic -BDNF/NT3- system, (3) phosphorylation of intracellular protein kinases (AKT, ERK), and (4) cell proliferation, maturation, and survival in the dorsal hippocampus.

MATERIALS AND METHODS

Ethics Statement

Experiments and procedures were conducted under strict adherence to the European Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and with Spanish regulations (RD 53/2013 and 178/2004). All efforts were made to minimize unnecessary suffering. All protocols were approved by the Ethics and Research Committee of Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

Subjects

Animal studies were conducted on 5 to 10-weeks-old male Wistar rats (Charles River Laboratories, Barcelona, Spain) weighing ~100 g at the beginning of the experiments. Rats were individually housed in clear plastic cages in a vivarium under standard controlled conditions: a 12-hour light/dark cycle (lights off at 8:00 pm.), ambient temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($65 \pm 5\%$); at the Animal House Centers of University of Málaga (Spain). Unless otherwise indicated, tap water and food (Purina chow) were available *ad libitum* throughout the course of these studies.

Ethanol Binge Exposure

This experimental model was designed to mimic the 1-day heavy drinking of the adolescent population. The experimental model and treatments were performed twice to constitute two batches. Young rats ($n = 80$) were firstly habituated to the experimental conditions, including handling and injection procedures (holding and pseudo-injection) during one week

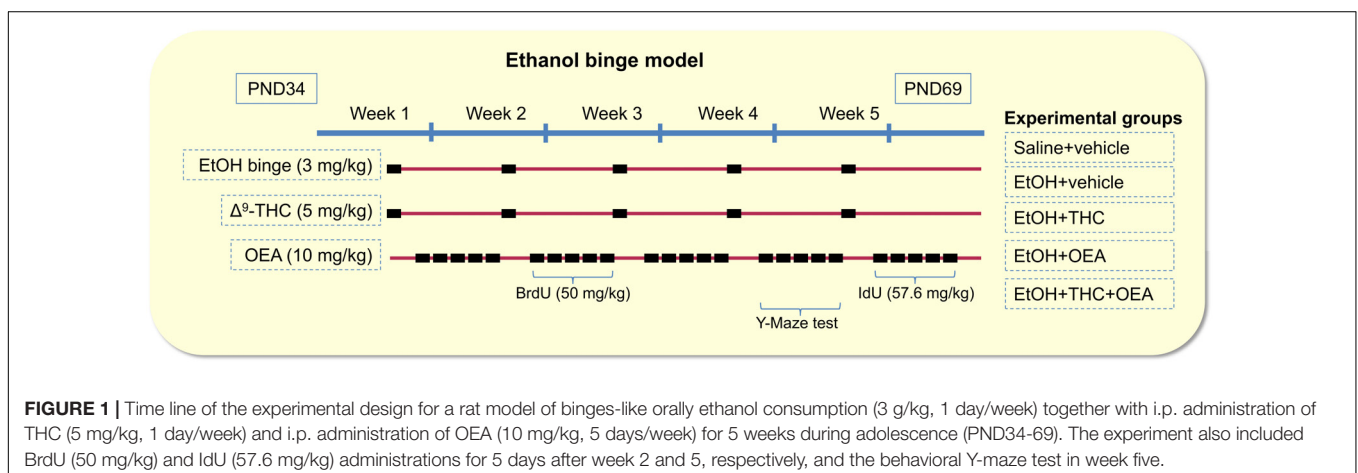
before the experimentation in order to minimize stress effects (Sánchez-Marín et al., 2017). Then, from PND34 to PND69, four groups of rats were weekly (on Friday) exposed to single binge intragastric (i.g.) administrations of 25% (v/v) ethanol (3 g/kg) for five consecutive weeks (Figure 1).

Drug Administration

Three groups of ethanol binge-exposed rats were treated with the principal psychoactive constituent of cannabis Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC or dronabinol; THC Pharm GmbH, Frankfurt am Main, Germany) and/or the endogenous PPAR α receptor agonist oleoylethanolamide (OEA; cat. no. 1484, Tocris, Abingdon, United Kingdom). THC were dissolved in a solution containing 25% (v/v) ethanol in sterile 0.9% NaCl solution. OEA were dissolved in a vehicle containing 10% (v/v) Tween80 in sterile 0.9% NaCl solution. Both drugs were prepared just before each administration, and they were intraperitoneally (i.p.) injected in a final volume of 1 mL/kg of body weight. The optimal dose at which treatment would be more effective in behavior and neuroprotection, as described previously (Piomelli et al., 2006; Galan-Rodriguez et al., 2009; Murphy et al., 2017), was selected for the present study. Two groups of ethanol binge-exposed rats were treated with 5 mg/kg of THC once per week (on Friday), just before ethanol i.g. administration, for five consecutive weeks. Two groups of ethanol binge-exposed rats were treated with 10 mg/kg of OEA, 48 h after THC and/or ethanol administrations, 5 days per week (from Sunday to Thursday) for five consecutive weeks. Thus, total sample ($n = 40$ per batch, $n = 8$ /group) was divided into five groups (Figure 1): Saline-Vehicle, Ethanol-Vehicle, Ethanol-OEA, Ethanol-THC, and Ethanol-OEA-THC.

BrdU and IdU Administration

5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; cat. no. B5002, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU; cat. no. I7125, Sigma-Aldrich) were dissolved at a concentration of 15 mg/mL in sterile 0.9% NaCl solution. To assess cell survival, all rats were treated with BrdU at a dose of 50 mg/kg (i.p.) for five consecutive days during the third week of experimentation



(Rivera et al., 2015). To assess cell proliferation, IdU were administered at a dose of 57.65 mg/kg (i.p.) for five consecutive days after the fifth week of experimentation (Figure 1).

Y-Maze Test

The effect of ethanol alone and combined with THC and/or OEA on short-term memory was evaluated using a Y-maze during the fifth week of experimentation. The maze has three interconnected closed arms, each one of them is 120° from the adjacent. The animal was placed into the middle of the maze and was allowed to freely explore the maze for 5 min. The movement of the animal inside the Y-maze was recorded by an overhead camera. The arms were thoroughly cleaned with a disinfectant solution with 70% ethanol and drying napkins to eliminate any residual odors of previous rats. Tests were performed 10 min after cleaning and 30 min after vehicle or OEA administrations. The number of arm entries were counted and acted as a marker of locomotor activity. The number of spontaneous alternations, as defined by entry into three different arms in sequence (triad), serves as a measure of short-term working memory. Percentage of spontaneous alternations was calculated from the number of triads and arm entries using the following equation: $Y = \text{number of triads} / (\text{total number of arm entries} - 2) \times 100$ (Nookala et al., 2018).

Sample Collection

Previous to sacrifice, all animals were intraperitoneally anesthetized (sodium pentobarbital, 50 mg/kg body weight) in a room separate from the other experimental animals.

The first batch of animals ($n = 8/\text{group}$) were sacrificed by decapitation and blood samples ($n = 8/\text{group}$) were briefly collected into tubes containing EDTA-2Na (1 mg/mL blood) and centrifuged (1600 g for 10 min, 4°C). Plasma samples were then frozen and stored at -80°C for hormonal analysis. The brains were also collected, snap-frozen and stored at -80°C. These brains were then prepared on dry ice to obtain 1-mm-thick sections by using razor blades and a rat brain slicer matrix. The dorsal hippocampus was precisely removed from -2.16 to -4.20 mm of Bregma levels (Paxinos and Watson, 2007) with fine surgical instruments. Hippocampal samples were weighed and stored at -80°C until they were used for real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot analyses.

A second batch of animals ($n = 8/\text{group}$) were perfused transcardially with 4% formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) and the brains were dissected out and kept in the same fixative solution overnight at 4°C. The brains were then cut into 30- μm -thick coronal sections by using a sliding microtome (Leica VT1000S) and divided in 12 parallel series. Sections were stored at 4°C in PB with 0.002% (w/v) sodium azide until they were used for immunostaining.

Enzyme-Linked Immunoassay Analysis

Plasma levels of BDNF were determined using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Invitrogen™ BDNF Rat ELISA Kit (#ERBDNF, Thermo Fisher Scientific, United States), following the manufacturer's instructions. To perform the ELISA

protocol in rat samples, we used 25 μL of plasma. A calibration curve and internal controls were included.

RNA Isolation and RT-qPCR Analysis

We performed RNA isolation, reverse transcription and RT-qPCR (TaqMan, Applied Biosystem, Carlsbad, CA, United States) as described previously (Rivera et al., 2015) using specific sets of primer probes (see **Supplementary Table S1**). Briefly, hippocampal samples were homogenized on ice and RNA was extracted following Trizol® method according to the manufacture's instruction (Gibco-BRL Life Technologies, Baltimore, MD, United States). RNA samples were isolated with RNeasy minElute cleanup-kit including digestion with DNase I column (Qiagen, Hilden, Germany). After reverse transcript reaction from 1 μg of mRNA, RT-qPCR was performed in a CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, United States) and the FAM dye label format for the TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific, United States). Melting curve analysis was performed to ensure that only a single product was amplified. Ct values were normalized in relation to *Actb* levels.

Western Blot Analysis

Western blotting was performed as described previously (Silva-Peña et al., 2018). An appropriate combination of primary and secondary HRP-conjugated antibodies was used: Phospho-(Thr202/Tyr204)-p44/42 MAPK (ERK1/2) rabbit polyclonal antibody (1:1,000, Cell Signaling, #9101), p44/42 MAPK (ERK1/2) rabbit monoclonal antibody (1:1,000, Cell Signaling, #4695), phospho-(Thr308)-AKT1/2/3 rabbit polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz, #sc-16646-R), AKT1/2/3 rabbit polyclonal antibody (1:1000, Santa Cruz, #sc-8312), adaptin γ mouse antibody (1:1,000, BD Biosciences, #610385) and HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (H+L) secondary antibodies (1:10,000, Promega, Madison, WI, United States). The membranes were incubated for 1 min with the Western Blotting Luminol Reagent kit (Santa Cruz, CA, United States), and the specific protein bands were visualized and quantified by chemiluminescence using a ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad). Western blots showed that each primary antibody detected a protein of the expected molecular size. The protein intensity was quantified with the image processing software ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, United States, NIH¹, 1997–2012). The results were expressed as the protein/adaptin γ and phosphorylated/total protein ratios.

Immunohistochemistry

Free-floating coronal sections from -2.16 to -4.20 Bregma levels (hippocampus) of each parallel series were selected for each immunohistochemistry (Rivera et al., 2015). Sections were incubated overnight in their respective following diluted primary antibodies at 4°C: mouse anti-BrdU (1:2,000; Hybridoma Bank, Iowa City, IA, United States; ref. G3G4), mouse anti-IdU (1:2000; Hybridoma Bank, ref. 32D8.D9) (Rivera et al., 2013). Sections were incubated in the appropriate secondary

¹<http://imagej.nih.gov/ij>

antibody biotinylated donkey anti-rabbit IgG (1:500; Sigma-Aldrich, #RPN1004) for 90 min. The sections were incubated in ExtrAvidin peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted 1:2000 in darkness at room temperature for 1 h. Immunolabeling was revealed with 0.05% diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich), 0.05% nickel ammonium sulfate and 0.03% H₂O₂ in PB-saline.

Stereological Cell Quantification

5-bromo-2'-deoxyuridine and IdU-immunoreactive (+) cell nuclei that came into focus were manually counted using a standard optical microscope with the 40 × objective (Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Netherlands) coupled to the NIS-Elements Imaging Software 3.00 (Nikon). Brain structure analyzed consisted of approximately 8 coronal sections (from -2.16 to -4.20 mm Bregma levels), which resulted in one of every eight equidistant sections (one representative section for each 240 μm) according to the rostro-caudal extent. Estimations of the number of positive cells in the hippocampal neurogenic niche SGZ in both hemispheres were calculated per sections (30 μm deep), according to a rat brain atlas and cytoarchitectonic criteria (Paxinos and Watson, 2007). Quantification was expressed as the average number of positive cells per section for each experimental group.

Statistical Analysis

Comparisons of data were carried out using IBM SPSS Statistical version 22 software (IBM, Armonk, NY, United States) and GraphPad Prism version 6 software (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Data are expressed as mean ± SEM for up to 8 determinations per experimental group (see legends in Figures 2–7). The Kolmogorov-Smirnov normality test, along with the Levene homoscedasticity test, were used to verify Gaussian distribution. Statistical analyses were performed using one-way analysis of variance (ANOVA) and two-way ANOVA (factor as OEA and THC), and Tukey's test corrected for multiple comparison or simple effect analysis when appropriate. A *p*-value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The Combined Administration of OEA and THC During Adolescence Restored the Ethanol-Induced Decreases in the Plasma Levels of BDNF

Significant changes in the circulating levels of BDNF were found ($F_{4,35} = 10.80$; $p < 0.0001$). Plasma levels of BDNF were decreased in the rats exposed to ethanol compared to those of saline-vehicle ones ($***p < 0.001$) (Figure 2). Two-way ANOVA did not indicate any significant interaction between factors (OEA and THC), but showed main effects of OEA ($F_{1,28} = 16.88$; $p = 0.0003$) and THC ($F_{1,28} = 7.874$; $p = 0.009$) on the plasma levels of BDNF. OEA or THC alone partially reversed ethanol-induced BDNF reduction in plasma, because significant differences were still found compared to saline-vehicle ones ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, respectively). The combined administration of OEA and THC completely restored the decrease in the plasma levels

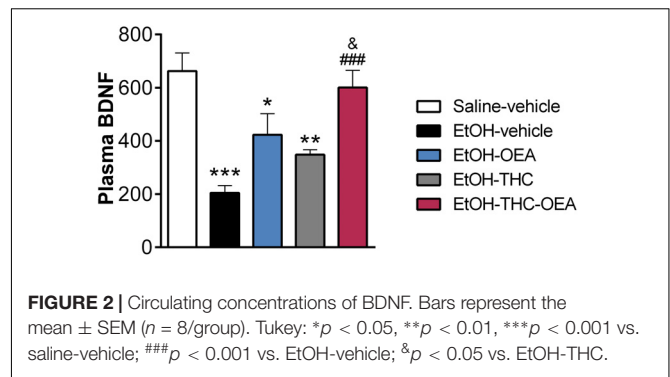


FIGURE 2 | Circulating concentrations of BDNF. Bars represent the mean ± SEM ($n = 8$ /group). Tukey: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. saline-vehicle; $###p < 0.001$ vs. EtOH-vehicle; $&p < 0.05$ vs. EtOH-THC.

of BDNF observed in rats exposed to ethanol ($***p < 0.001$) and THC/ethanol-exposed rats ($&p < 0.05$) (Figure 2). OEA at a dose of 5 mg/kg/day administered for 6 consecutive days did not modify significantly the plasma levels of BDNF (Supplementary Figure S1).

OEA Decreases *Bdnf*, *Ntf3*, and *TrkC*, and Increases *TrkB* in the Hippocampi of Rats Exposed to Ethanol Binges and THC During Adolescence

Statistical analysis indicated significant differences in the hippocampal mRNA levels of *Bdnf*, *Ntf3*, and *TrkB* ($F_{4,30} > 6.59$; $p < 0.0006$), but not *TrkC* and *Lngfr*. The hippocampi of rats exposed to ethanol had higher mRNA levels of *TrkB* compared to those of saline-vehicle ones ($**p < 0.01$) (Figures 3A–E). Two-way ANOVA indicated significant interaction between factors (OEA and THC) in the mRNA levels of *Ntf3* ($F_{1,24} = 16.44$; $p < 0.0001$). A main effect of OEA on the mRNA levels of *Ntf3* was found ($F_{1,24} = 22.49$; $p < 0.0001$). Main effects of THC on the mRNA levels of *Bdnf* ($F_{1,24} = 41.08$; $p < 0.0001$) and *Ntf3* ($F_{1,24} = 20.11$; $p < 0.0001$) were also observed. OEA decreased hippocampal mRNA levels of *Ntf3* in ethanol-exposed rats compared to those of ethanol-vehicle rats ($#p < 0.05$) and saline-vehicle rats ($***p < 0.001$) (Figure 3B). THC decreased hippocampal mRNA levels of *Bdnf* and *Ntf3* in ethanol-exposed rats compared to those of ethanol-vehicle rats ($#p < 0.05$, $##p < 0.01$) and saline-vehicle rats ($**p < 0.01$, $***p < 0.001$) (Figures 3A,B). OEA in THC/ethanol-exposed rats also decreased hippocampal mRNA levels of *Bdnf* and *Ntf3*, as well as *TrkC*, but specifically increased mRNA levels of *TrkB* compared to those of ethanol-vehicle rats ($#p < 0.05$, $##p < 0.01$, $###p < 0.001$) (Figures 3A–D). The hippocampi of THC/ethanol-exposed rats with and without OEA administration had higher mRNA levels of *Lngfr* compared to those of saline-vehicle rats ($**p < 0.01$) (Figure 3E).

OEA Increases the Phosphorylation of AKT and ERK1 in the Hippocampi of Rats Exposed to Ethanol Binges During Adolescence

Statistical analysis indicated significant changes in the protein levels of total and phosphorylated AKT ($F_{4,21} > 3.60$; $p < 0.026$),

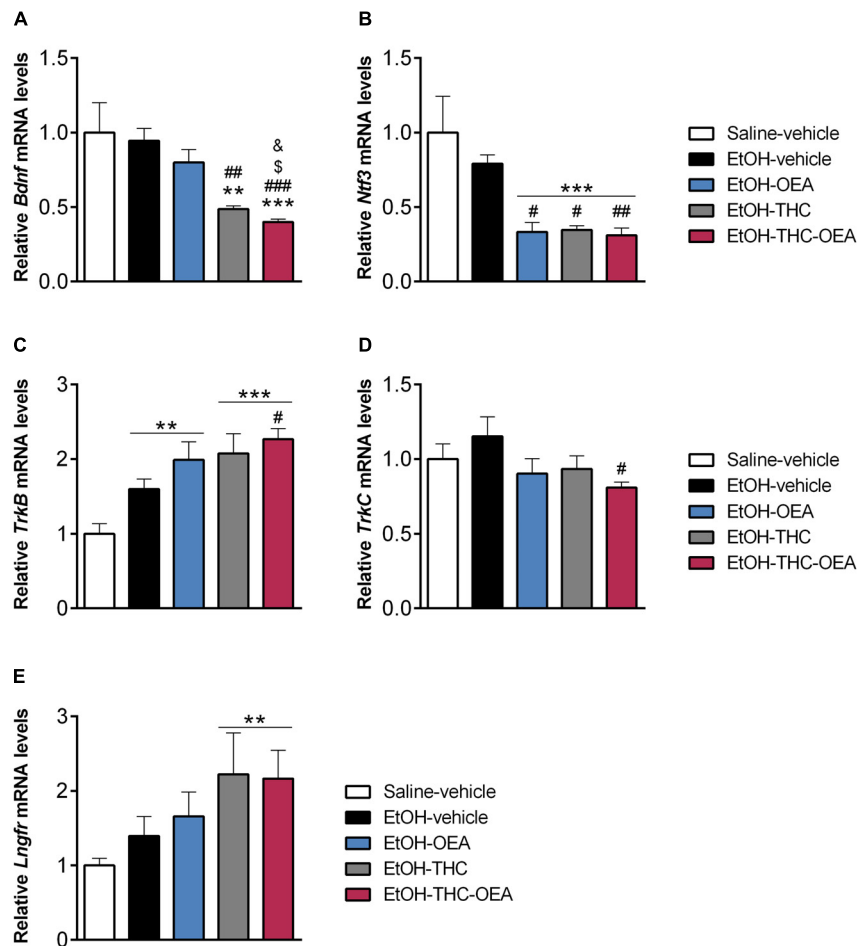


FIGURE 3 | Relative mRNA levels of the neurotrophic factors *Bdnf* (A) and *Ntf3* (B), and its receptors *TrkB* (C), *TrkC* (D), and *Lngfr* (E) in the hippocampus. Bars represent the mean \pm SEM ($n = 7$ /group). Tukey (A–C) or simple effect analysis (D,E): ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. saline-vehicle, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. EtOH-vehicle, and & $p < 0.05$ vs. EtOH-THC.

total and phosphorylated ERK1 ($F_{4,21} > 3.16$; $p < 0.040$), and total ERK2 ($F_{4,21} = 4.14$; $p < 0.015$) in the hippocampus. Specifically, the hippocampi of rats exposed to ethanol had higher total protein levels, but lower phosphorylated protein levels of ERK1 and ERK2 compared to those of saline-vehicle ones ($*p < 0.05$) (Figures 4A–G). Two-way ANOVA did not indicate any significant interaction between factors (OEA and THC). Main effects of THC on the total ($F_{1,14} = 7.14$; $p = 0.023$) and phosphorylated ($F_{1,14} = 20.14$; $p = 0.001$) protein levels of AKT were observed. Main effects of OEA on the total protein levels of ERK1 ($F_{1,14} = 9.58$; $p = 0.011$) and ERK2 ($F_{1,14} = 7.73$; $p = 0.019$), and phosphorylated protein levels of ERK1 ($F_{1,14} = 6.29$; $p = 0.031$) were found. THC increased total protein levels of AKT, ERK1 and ERK2 (Figures 4A,C,E), but decreased AKT phosphorylation (Figure 4B) in ethanol-exposed rats compared to those of saline-vehicle rats ($*p < 0.05$, ** $p < 0.01$). OEA decreased total protein levels of AKT, ERK1, and ERK2 in ethanol-exposed rats compared to those of ethanol-vehicle rats ($#p < 0.05$, ## $p < 0.01$) (Figures 4A,C,E). OEA increased the phosphorylated protein levels of AKT and

ERK1 in ethanol-exposed rats compared to those of ethanol-vehicle rats ($#p < 0.05$, ## $p < 0.01$) (Figures 4B,D). OEA administered in THC/ethanol-exposed rats did not increase AKT phosphorylation as significant differences were found compared to OEA/ethanol-exposed rats (&& $p < 0.01$) (Figure 4B). Contrary, the increased ERK1 phosphorylation was conserved when OEA was administered in THC/ethanol-exposed rats ($#p < 0.05$) (Figure 4D).

The Combined Administration of OEA and THC Decreases *Mki67*, *Dcx*, *Calb1*, and *Casp3* in the Hippocampi of Rats Exposed to Ethanol Binges During Adolescence

Statistical analysis indicated significant differences in the hippocampal mRNA levels of *Mki67*, *Dcx*, *Calb1*, and *Casp3* ($F_{4,30} > 6.37$; $p < 0.0008$), but not *Sox2* and *Ncam*. Specifically, the hippocampi of rats exposed to ethanol had lower mRNA levels of the cellular marker for proliferation *Mki67* compared

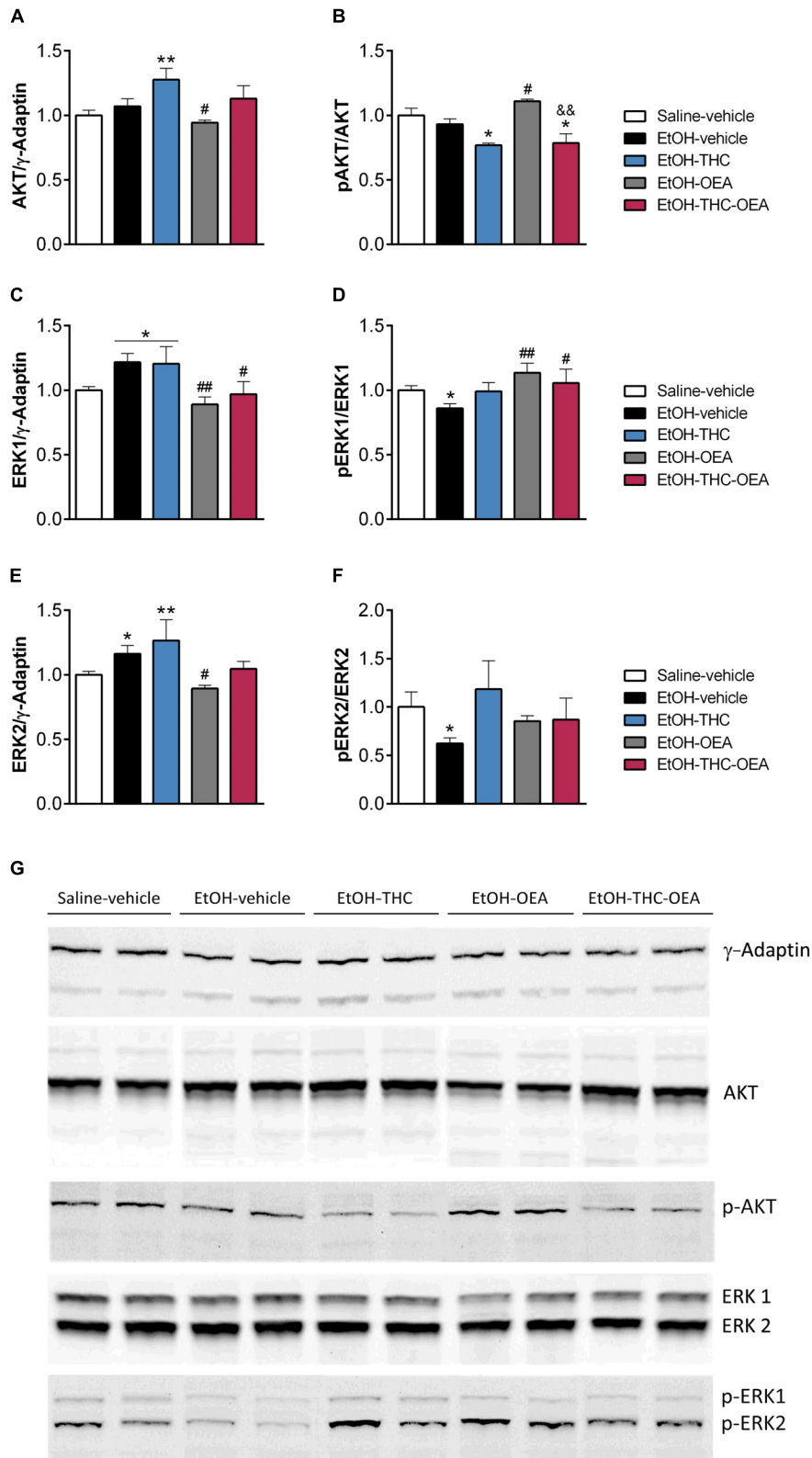


FIGURE 4 | Relative protein levels of AKT (A), phospho-AKT (B), ERK1 (C), phospho-ERK1 (D), ERK2 (E) and phospho-ERK2 (F) in the hippocampus as well as representative immunoblots (G). Bars represent the mean \pm SEM ($n = 4$ /group). Tukey (A–E) or simple effect analysis (F): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. saline-vehicle, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. EtOH-vehicle, and && $p < 0.01$ vs. EtOH-THC.

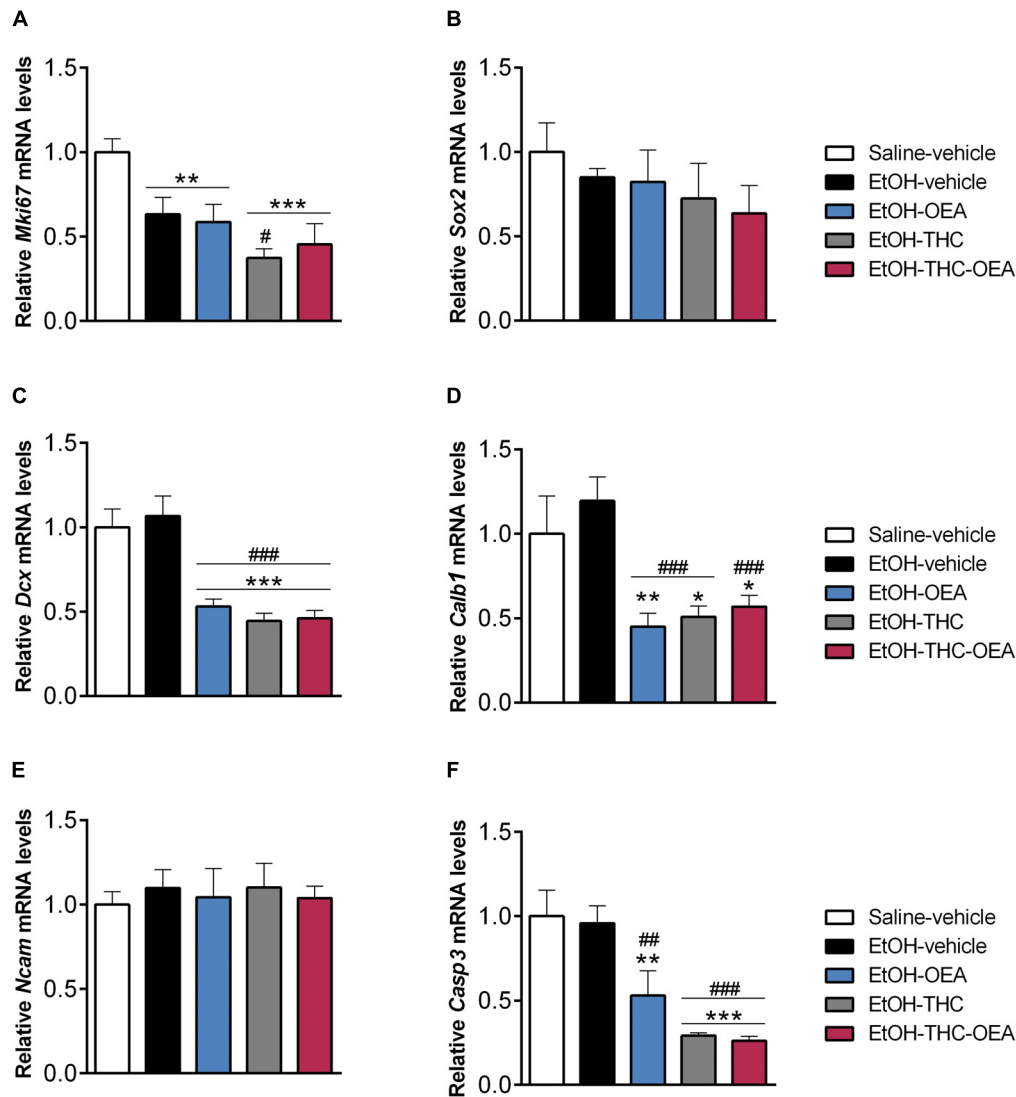


FIGURE 5 | Relative mRNA levels of the neurogenic factors *Mki67* (A), *Sox-2* (B), *Dcx* (C), *Calb1* (D) and *Ncam* (E), and the apoptotic protease *Casp3* (F) in the hippocampus. Bars represent the mean \pm SEM ($n = 7$ /group). Tukey (A,C,D,F) or simple effect analysis (B,E): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. saline-vehicle; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. EtOH-vehicle.

to those of saline-vehicle rats (** $p < 0.01$) (Figure 5A). Two-way ANOVA indicated significant interaction between factors (OEA and THC) in the mRNA levels of *Dcx* ($F_{1,24} = 12.54$; $p = 0.0017$), *Calb1* ($F_{1,24} = 15.88$; $p = 0.0005$), and *Casp3* ($F_{1,24} = 4.81$; $p = 0.038$). Main effects of OEA and THC on the mRNA levels of *Dcx* ($F_{1,24} > 11.25$; $p < 0.002$), *Calb1* ($F_{1,24} > 7.87$; $p < 0.009$) and *Casp3* ($F_{1,24} > 6.40$; $p < 0.01$) were also observed. The administration of OEA and THC alone decreased mRNA levels of *Dcx*, *Calb1*, and *Casp3* in ethanol-exposed rats compared to those of saline-vehicle rats (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) and ethanol-vehicle rats (## $p < 0.01/0.001$, ### $p < 0.001$) (Figures 5C–F). Specifically, simple effect analysis indicated that THC alone decreased mRNA levels of *Mki67* in ethanol-exposed rats (# $p < 0.05$), but this effect was erased when OEA was also administered (Figure 5A).

No significant changes in mRNA levels of *Sox2* and *Ncam* were observed (Figures 5B,E).

OEA Modulates the THC-Related Decreases in Both Neural Stem Cell Proliferation and Newborn Cell Survival in the SGZ of Rats Exposed to Ethanol Binges During Adolescence

Statistical analysis indicated significant changes in the number of BrdU+ cells ($F_{4,35} = 5.70$; $p < 0.0013$), but not the number of IdU+ cells. Specifically, ethanol binges did not produce any effect on the number of BrdU+ cells (newborn cell survival) and the number of IdU+ cells (cell proliferation) in the SGZ of the dentate gyrus (Figure 6). Two-way ANOVA

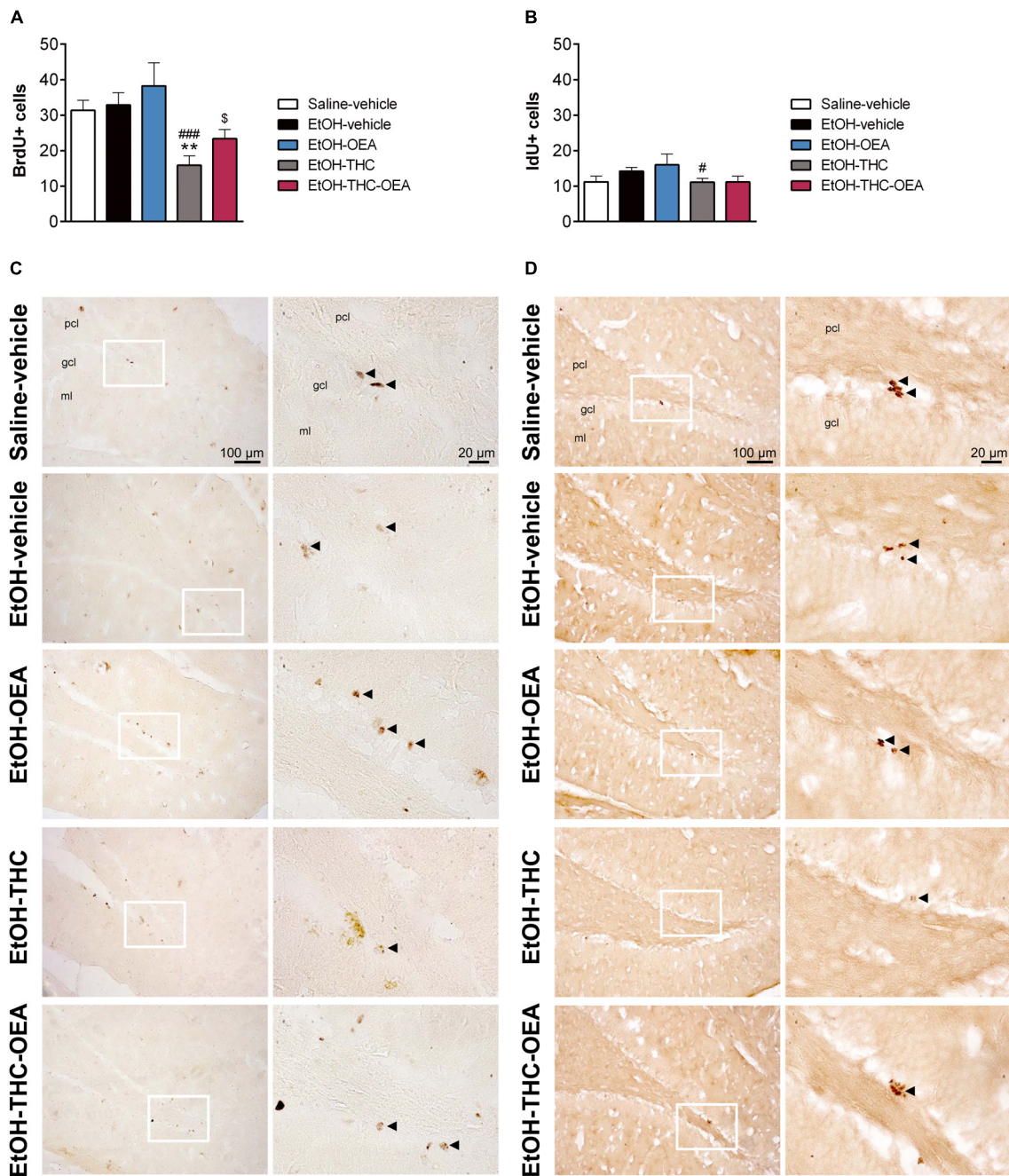
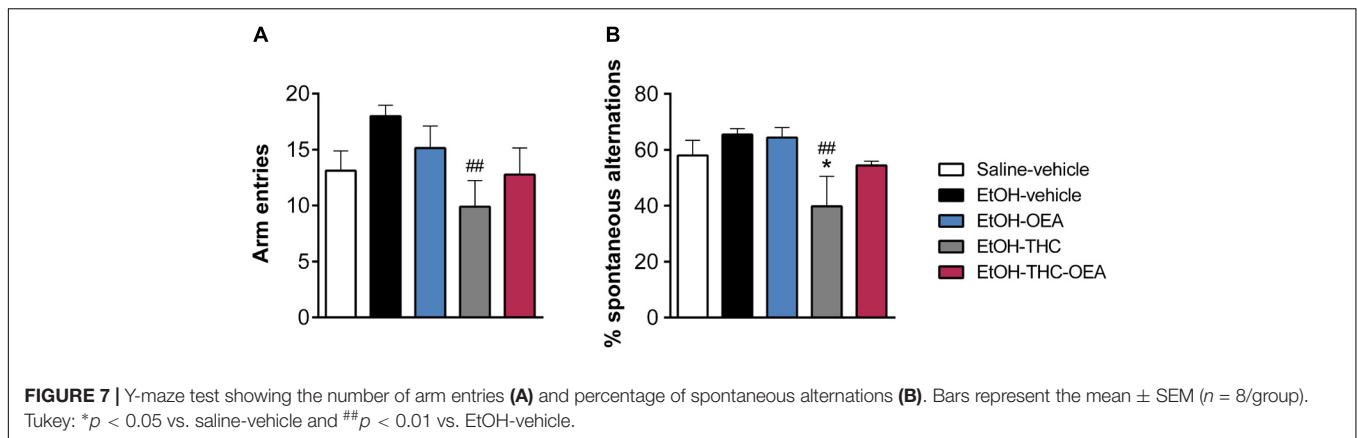


FIGURE 6 | Newborn cell survival **(A)** and neural stem cell proliferation **(B)** respectively, assessed by the number of BrdU and IdU-immunoreactive (+) cells in the SGZ of the dentate gyrus. Low and high-resolution photomicrographs of representative images showing BrdU+ cells **(C)** and IdU+ cells, and **(D)**. Arrowheads indicate labeled nuclei. Bars represent the mean \pm SEM ($n = 7-8$ /group). Tukey **(A)** or simple effect analysis **(B)**: ** $p < 0.01$ vs. saline-vehicle and # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. EtOH-vehicle.

did not indicate any significant interaction between factors (OEA and THC). Main effects of THC, but not OEA, on the number of BrdU+ cells ($F_{1,8} = 11.84$; $p < 0.01$) and IdU+ cells ($F_{1,8} = 10.53$; $p = 0.011$) were observed. OEA alone did not modify the number of BrdU+ and IdU+ cells in the SGZ of ethanol-exposed rats. THC reduced the

number of BrdU+ and IdU+ cells in ethanol-exposed rats compared to those of saline-vehicle rats (** $p < 0.01$) and ethanol-vehicle rats (### $p < 0.001$) (**Figures 6A,B**). However, these effects of THC on SGZ cell proliferation and survival in ethanol-exposed rat were modulated when OEA was also administered.



OEA Blocked Short-Term Spatial Memory Impairment in Rats Exposed to THC and Ethanol Binges During Adolescence

Statistical analysis indicated significant differences in the ratio between series and entries (percentage of spontaneous alteration) in the Y-maze ($F_{4,35} = 3.10$; $p = 0.026$), but not the number of arm entries ($F_{4,35} = 2.26$; $p = 0.058$), used as an index of activity. Specifically, ethanol binges did not produce any effect on spontaneous alternation or activity (arm entries) in the Y-maze (Figure 7). Two-way ANOVA did not indicate any significant interaction between factors (OEA and THC). Main effects of THC, but not OEA, on the number of arm entries ($F_{1,26} = 6.46$; $p = 0.016$) and the percentage of spontaneous alteration ($F_{1,26} = 6.03$; $p = 0.02$) were observed. THC affected both memory (reduced spontaneous alternation) and activity (arm entries) in ethanol-exposed rats ($##p < 0.01$) (Figures 7A,B). This memory and motor impairment induced by the combination of THC and ethanol was blocked by OEA (Figures 7A,B).

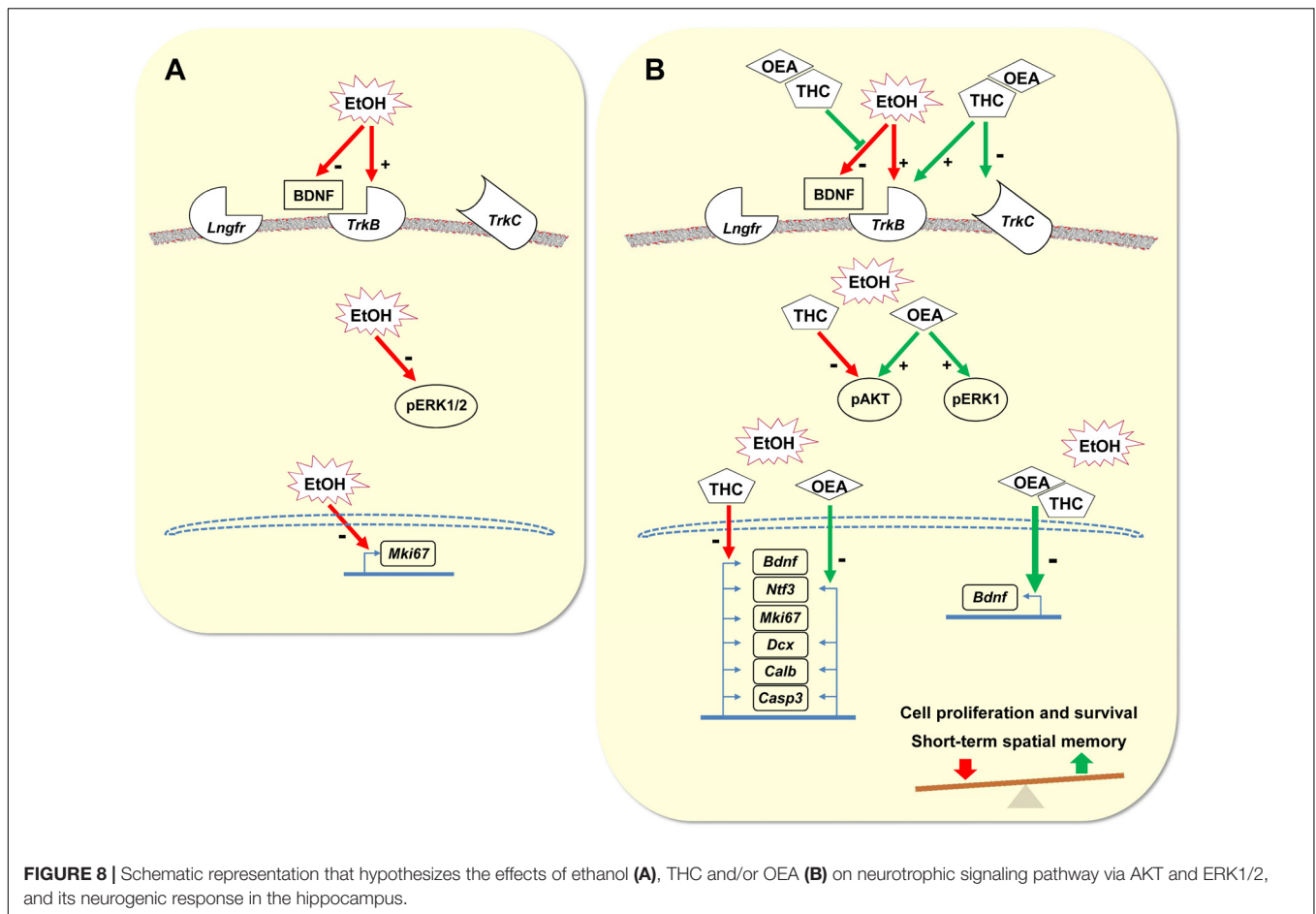
DISCUSSION

In the present study we evaluated the effects of OEA treatment (10 mg/kg, i.p.), 48 h after acute administration of THC (5 mg/kg, i.p.) and/or ethanol binge (3 g/kg, i.g.), on the mRNA levels of main components of the neurotrophic (BDNF and NT3) system, the phosphorylation of intracellular protein kinases (AKT, ERK), and the cell proliferation, maturation and survival in the dorsal hippocampus. The Y-Maze test was also tested as a behavioral assessment tool for short-term spatial memory. The main findings are as follows (see Figure 8 for summary): (1) The regimen of ethanol binges decreased the plasma concentrations of BDNF, the phosphorylated levels of the MAP kinases ERK1/2, the mRNA levels of the neurotrophic receptor *TrkB* and the cellular factor for proliferation *Mki67* in the hippocampus (Figure 8A), but did not affect other factors related to neurogenesis or spatial memory, (2) The combination of THC and ethanol reduced short-term spatial memory, the mRNA levels of *Bdnf* in the hippocampus, and

the cell proliferation (*Mki67* and IdU+ cell population) and survival (*Casp3* and BrdU+ cell population) in the dorsal hippocampus, (3) The repeated administration of OEA in the ethanol-exposed rats modulated the plasma levels of BDNF, and increased the hippocampal levels of phospho-AKT and phospho-ERK1, key signaling regulators of neurogenesis and cell survival (Figure 8B), (4) Both OEA and THC produced similar effects on the mRNA levels of neurotrophic (*Ntf3*), maturation (*Dcx*, *Calb1*) and pro-apoptotic (*Casp3*) factors in the hippocampus of ethanol-exposed rats, (5) Interestingly, the repeated administration of OEA in rats previously exposed to both ethanol and THC normalized the plasma levels of BDNF, enhanced the effects on the hippocampal mRNA levels of *Bdnf* and the neurotrophic receptors *TrkB* and *TrkC*, and sustained the phosphorylated levels of ERK1, and (6) These last effects were likely associated with a recovery of short-term spatial memory and newborn cell survival in the SGZ of the dentate gyrus (Figure 8B).

We have recently demonstrated that the continuous exposure of ethanol in a 4-bottle choice paradigm affects neurotrophin signaling pathway through a deactivation of the neurogenic regulator MAP kinase ERK2 and a decrease in mRNA levels of the neurogenic factors *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam1*, and *Calb1* (Silva-Peña et al., 2018). Nevertheless, the concrete effect of ethanol on neurotrophic factors remains unclear, and different associations between BDNF and ethanol consumption have been previously described (Joe et al., 2007; Costa et al., 2011; Reynolds et al., 2015; Geoffroy and Noble, 2017). In this regard, previous studies indicated that a decrease in BDNF levels in plasma was associated with ethanol consumption (García-Marchena et al., 2017b; Silva-Peña et al., 2018). This effect was also linked to withdrawal severity (Heberlein et al., 2010). In the present study, we go further into this hypothesis as we described a decrease in BDNF levels in the plasma of rats exposed to ethanol binges (3 g/kg) once a week for 5 weeks during adolescence. This finding is relevant for establishing BDNF as a biomarker of single weekly alcohol consumption during adolescence despite not affecting neither cognition nor neurogenesis.

We also examined the effect of ethanol binges together with the administration of THC (5 mg/kg), a principal psychoactive component of cannabis that activates CB1 and CB2 receptors.



Cannabis is the most widely used illicit drug, and the disruption of learning and memory are commonly reported consequences of cannabis use. In agreement with our results in ethanol-exposed rats, spatial memory impairment by THC has been demonstrated in adolescent animals (Steel et al., 2011; Segal-Gavish et al., 2017) and healthy humans (D'Souza et al., 2009). Molecular mechanisms underlying behavioral alteration by cannabis are not completely described, although the importance of adaptive changes in neuroplasticity (synaptic number and strength) and neurogenesis during learning are accepted (Steel et al., 2014). Endocannabinoid system regulates several physiological processes such as anxiety (Ahn et al., 2008), nociception (Pertwee, 2001) and memory (Marsicano et al., 2002). Systemic and intra-hippocampal administration of CB1 receptors agonists, including THC (5.6 mg/kg, i.p.), impair hippocampal-dependent memory/learning tasks (Wegener et al., 2008; Wise et al., 2009; Hasanein and Teimuri Far, 2015). Moreover, intra-hippocampal administration of the CB1 receptor antagonist rimonabant (0.06 μ g/rat) completely attenuated the memory disruptive effects of cannabinoids (Wise et al., 2009). This tendency is consistent with our study because THC induced short-term memory impairment assessed by lower spatial alternations. However, the effects of cannabinoids on plasticity activity of the neuron do not necessary follow simple patterns, particularly

when memory processes are involved (Abush and Akirav, 2010). In fact, a recent dose-response study (Suliman et al., 2018) reported that THC administered in rats at a dose of 1.5 mg/kg improved cognitive functions and enhanced the markers involved in hippocampal neurogenesis including DCX and BDNF. These effects were not observed when THC was administered at doses of 0.5 and 3 mg/kg (Suliman et al., 2018), suggesting a biphasic (impairing or enhancing) role of CB1 receptor activation in both adult neurogenesis and memory activities (Calabrese and Rubio-Casillas, 2018). Other studies have shown that THC prevents neurodegenerative processes occurring in animal models of Alzheimer's disease, protects from inflammation-induced cognitive damage, and restores memory and cognitive function in old mice (Martín-Moreno et al., 2012; Aso et al., 2015). CB2 receptor was also related to memory and synaptic plasticity (García-Gutiérrez et al., 2013; Li and Kim, 2016). Activation of CB2 receptors by the administration of different selective CB2 receptor agonists (O-1966 and MDA7) reversed amyloid-induced memory deficiency and improves memory retention following stroke in mice (Wu et al., 2013; Ronca et al., 2015). So, we cannot discard that the biphasic effect of THC on neural plasticity could be linked to a putative positive/negative balance between CB1/CB2 receptor activation. Regarding our results, we propose that THC at a dose of 5 mg/kg

likely facilitates the expected deleterious effects of alcohol on hippocampal neurogenesis and spatial memory.

Oleylethanolamide is a satiety factor capable of controlling contextual memories associated with alcohol relapse (Bilbao et al., 2016). In addition, alcohol withdrawal symptoms are supported by the decrease in OEA levels and its adaptive nature as a homeostatic signal (Bilbao et al., 2016). Interestingly, OEA injection (5 and 20 mg/kg) at the beginning of withdrawal (when OEA levels are dropping) produced a lower severity of the withdrawal symptoms (Bilbao et al., 2016). These results support previous clinical studies suggesting that OEA levels are altered in alcohol-dependence during abstinence and might be a potential marker for predicting length of alcohol abstinence (García-Marchena et al., 2017a). Human genetic reports also described an association between AUD and polymorphisms/mutation of the gene encoding the NAE-hydrolyzing enzyme fatty-acid amide hydrolase (FAAH) (Sipe et al., 2002). Inhibition of FAAH, the enzyme responsible for the degradation of the NAEs anandamide and OEA (Cravatt et al., 1996), enhances memory and does not induce the adverse effects of CB1 receptor agonists (Hasanein and Teimuri Far, 2015; Rivera et al., 2018). Moreover, inhibition of FAAH promotes memory acquisition through OEA and PPAR α activation (Mazzola et al., 2009). Our findings reinforce the hypothesis that repeated treatment of OEA can exert functional recovery of THC-related cognitive impairments and neuroprotective effects via triggering of adult neurogenesis in the hippocampi of ethanol-exposed rats during adolescence.

Despite the association between OEA and BDNF has been barely studied, the chronic treatment with OEA markedly improves spatial cognitive deficits through enhancing neurogenesis and BDNF expression in the hippocampus after acute cerebral ischemic injury (Yang et al., 2015). Several studies reported that THC increases BDNF levels in the plasma of rats (Suliman et al., 2018) and the serum of healthy humans (D'Souza et al., 2009). In our study, plasma BDNF concentrations were decreased after ethanol binges. Interestingly, while THC and OEA slightly or partially blocked the ethanol effect when they were separately administered, the combination of both drugs in the ethanol-exposed rats induced a synergistic effect that completely equalized BDNF levels to saline-vehicle group. The molecular mechanisms involved in the ethanol-induced decrease of circulating BDNF remain to be elucidated but reinforces the notion of BDNF as a biomarker of alcohol consumption.

The relevance of these findings was further explored when we analyzed hippocampal expression of neurotrophins, their receptors, molecular signaling, and transcriptional response. Interestingly, THC decreased the mRNA levels of *Bdnf* and *Ntf3* in the hippocampus. Concomitant OEA and THC did not restore neurotrophin expression but, synergistically, increased the mRNA levels of the receptor binding BDNF *TrkB* and decreased the mRNA levels of receptor binding NT-3 *TrkC*. Further studies are necessary to explain the apparent contradiction between the effects of THC and OEA on the hippocampal expression of BDNF and its receptor *TrkB*. Besides, synergistic reduction in *Ntf3* and *TrkC* mRNA levels by THC and OEA suggest a relevant impact on NT-3 signaling system in a context of ethanol binges.

This hypothesis is consistent with the intracellular signaling in the hippocampi of ethanol-exposed rats. The decreased levels of ERK1 phosphorylation induced by ethanol was specifically counteracted by OEA. We propose that this effect may be related to a sensitization of BDNF-TRKB signaling. Moreover, the increased levels of AKT phosphorylation induced by OEA agree with an activation of this signaling pathway (please, see **Figure 8B** for schematic summary). Regarding the neurogenic response, THC specifically enhanced the ethanol-related reduction in mRNA levels of the cellular factor for proliferation *Mki67*, an effect that was in agreement with the lower number of IdU+ cells in the SGZ. Similar effects of THC and OEA were found on the factors maturing neurons *Dcx* and *Calb1*. Besides, hippocampal mRNA levels of *Casp3*, a neural marker of apoptosis, was also decreased by both OEA and THC. Interestingly, OEA blocked the lower number of SGZ BrdU+ cells induced by THC. These last results suggest that both OEA and THC may abrogate a cell death response in the hippocampus under an alcoholic context, but only OEA may amplify this anti-apoptotic signal into the hippocampal neurogenic niche.

CONCLUSION

In conclusion, ethanol binge drinking during adolescence impairs circulating BDNF concentrations and ERK signaling in the hippocampus. THC associated with ethanol specifically induced a deleterious effect on both short-term memory and in a number of neurotrophic (*Bdnf*, *Ntf3*) and neurogenic (*Mki67*, *Dcx*, *Calb1*) factors in the hippocampus, a region widely related to synaptic plasticity of the neuron. Administration of OEA alone or in combination with THC in ethanol-exposed rats restored ethanol-related BDNF deficiency in plasma, increased the expression of the BDNF receptor *TrkB* and intracellular signaling (AKT and ERK1 phosphorylation), and sustained a reduced expression of maturation (*Dcx* and *Calb1*) and pro-apoptotic (*Casp3*) responses in the hippocampus. Finally, OEA may be related to a likely positive effect on newborn cell survival in the hippocampus and short-term spatial memory. Therefore, OEA and others putative PPAR α activators are interesting targets to be further investigated to unveil novel therapeutic strategies approaching cognitive impairment and pathologies related to AUD.

LIMITATIONS AND FUTURE PERSPECTIVE

This study examined the single effects of THC and OEA, and their interaction, on short-term spatial memory and neurogenesis through BDNF/AKT/ERK signaling in the dorsal hippocampus of adolescent rats exposed to ethanol binge drinking. It was not intended to evaluate the actions of these compounds in normal animals, so we decided to focus only in ethanol-exposed ones. Although our findings support the hypothesis of a protective role of OEA in response to ethanol, we are

aware of the limitations of the present study. First, the lack of female rats in the experimental design is an important limitation of the present study. Same-sex representativeness and the effect of sexual dimorphism on reactivity to abuse drugs and treatments should be definitely addressed for all experiments in pre-clinical research (McCullough et al., 2014). Second, the lack of a factorial design that includes naïve-ethanol groups is another important limitation of the present study. Despite main effects and interaction of OEA and THC in rats exposed to ethanol were evaluated by two-way ANOVA, independent effects and interactive effects between drugs and ethanol were not assessed, limiting our findings to the alcohol-exposure context only. Third, the experiments of the present study were designed to mimic the one-day heavy drinking of adolescents and to evaluate vulnerability to ethanol during adolescence (Fabio et al., 2014), so we cannot extrapolate to heavy binge drinking in adults. In addition, the magnitude of the effect cannot be estimated because we used only one dose for OEA or THC. Although drug doses were selected regarding effectiveness based on previous studies (Piomelli et al., 2006; Galan-Rodríguez et al., 2009; Bilbao et al., 2016; Murphy et al., 2017; Antón et al., 2017, 2018), the use of a dose-response design might have offered more information concerning the effects of the drugs tested. Finally, although the amount of ethanol administered with the vehicle solution for THC was small (0.2 g/kg), we must consider the potential induction of biological responses that could interfere with the outcomes measured.

ETHICS STATEMENT

All protocols were approved by the Ethics and Research Committee of Universidad de Málaga (CEUMA, 7-2016-A).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FR and JS conceived and designed the study. DS-P, PR, FA, AV, and NG-M acquired the data. DS-P, PR, LR, FP, and AS analyzed

and interpreted the data. DS-P and JS drafted the manuscript. FR and JS Reviewed and edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

FUNDING

All sources of funding received for the research have been submitted. All funds received included open Access publication fees.

ACKNOWLEDGMENTS

RETICS Red de Trastornos Adictivos, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) and European Regional Development Funds-European Union (ERDF-EU; RD16/0017/0001); ISCIII, MINECO, ERDF-EU (JS: PI16/01374; FR: PI16/01698; FJ: PI16/01953; AS: PI17/02026) Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad and Plan Nacional sobre Drogas (JS: PNSD2015/047; AS: PND2017/043; FRF: PND2018/044); Consejería de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo, Junta de Andalucía, ERDF-EU (FR: CTS-8221); Consejería de Salud, Junta de Andalucía, ERDF-EU (FR: SAS111224). FP (CP14/00212) and AS (CP14/00173) are recipients of a research contract from “Miguel Servet” Program of ISCIII, ERDF-EU. JS holds a “Miguel Servet II” research contract from the National System of Health, ISCIII, ERDF-EU, FIMABIS (CPII17/00024). PR holds a “Sara Borrel” research contract from ISCIII, ERDF-EU (CD16/00067).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00096/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abush, H., and Akirav, I. (2010). Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus* 20, 1126–1138. doi: 10.1002/hipo.20711
- Ahn, K., McKinney, M. K., and Cravatt, B. F. (2008). Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem. Rev.* 108, 1687–1707. doi: 10.1021/cr0782067
- Andero, R., Dias, B. G., and Ressler, K. J. (2014). A role for Tac2, Nk1, and Nk3 receptor in normal and dysregulated fear memory consolidation. *Neuron* 83, 444–454. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.028
- Antón, M., Alén, F., Gómez de Heras, R., Serrano, A., Pavón, F. J., Leza, J. C., et al. (2017). Oleylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict. Biol.* 22, 724–741. doi: 10.1111/adb.12365
- Antón, M., Rodríguez-González, A., Rodríguez-Rojo, I. C., Pastor, A., Correias, Á, Serrano, A., et al. (2018). Increased plasma oleylethanolamide and palmitoleylethanolamide levels correlate with inflammatory changes in alcohol binge drinkers: the case of HMGB1 in women. *Addict. Biol.* 23, 1242–1250. doi: 10.1111/adb.12580
- Aso, E., Sanchez-Pla, A., Vegas-Lozano, E., Maldonado, R., and Ferrer, I. (2015). Cannabis-based medicine reduces multiple pathological processes in AbPP/PS1 mice. *J. Alzheimers Dis.* 43, 977–991. doi: 10.3233/JAD-141014
- Bilbao, A., Serrano, A., Cipitelli, A., Pavón, F. J., Giuffrida, A., Suárez, J., et al. (2016). Role of the satiety factor oleylethanolamide in alcoholism. *Addict. Biol.* 21, 859–872. doi: 10.1111/adb.12276
- Bodart, J. F. (2010). Extracellular-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase cascade: unsolved issues. *J. Cell. Biochem.* 109, 850–857. doi: 10.1002/jcb.22477
- Calabrese, E. J., and Rubio-Casillas, A. (2018). Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12920. doi: 10.1111/eci.12920
- Costa, M. A., Girard, M., Dalmay, F., and Malauzat, D. (2011). Brain-derived neurotrophic factor serum levels in alcohol-dependent subjects 6 months after alcohol withdrawal. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 35, 1966–1973. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01548.x
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A., and Gilula, N. B. (1996). Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384, 83–87. doi: 10.1038/384083a0

- Crews, F. T., Vetreno, R. P., Broadwater, M. A., and Robinson, D. L. (2016). Adolescent alcohol exposure persistently impacts adult neurobiology and behavior. *Pharmacol. Rev.* 68, 1074–1109. doi: 10.1124/pr.115.012138
- D'Souza, D. C., Pittman, B., Perry, E., and Simen, A. (2009). Preliminary evidence of cannabinoid effects on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in humans. *Psychopharmacology* 202, 569–578. doi: 10.1007/s00213-008-1333-2
- Fabio, M. C., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., and Pautassi, R. M. (2014). Binge ethanol intoxication heightens subsequent ethanol intake in adolescent, but not adult, rats. *Dev. Psychobiol.* 56, 574–583. doi: 10.1002/dev.21101
- Galan-Rodríguez, B., Suarez, J., Gonzalez-Aparicio, R., Bermudez-Silva, F. J., Maldonado, R., Robledo, P., et al. (2009). Oleylethanolamide exerts partial and dose-dependent neuroprotection of substantia nigra dopamine neurons. *Neuropharmacology* 56, 653–664. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.11.006
- García-Gutiérrez, M. S., Ortega-Álvarez, A., Busquets-García, A., Pérez-Ortiz, J. M., Caltana, L., Ricatti, M. J., et al. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology* 73, 388–396. doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.05.034
- García-Marchena, N., Pavon, F. J., Pastor, A., Araos, P., Pedraz, M., Romero-Sanchiz, P., et al. (2017a). Plasma concentrations of oleylethanolamide and other acylethanolamides are altered in alcohol-dependent patients: effect of length of abstinence. *Addict. Biol.* 22, 1366–1377. doi: 10.1111/adb.12408
- García-Marchena, N., Silva-Peña, D., Martín-Velasco, A. I., Villanúa, M. Á., Araos, P., Pedraz, M., et al. (2017b). Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. *PLoS One* 12:e0187634. doi: 10.1371/journal.pone.0187634
- Geoffroy, H., and Noble, F. (2017). BDNF During Withdrawal. *Vitam. Horm.* 104, 475–496. doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.009
- Gonzalez-Aparicio, R., Blanco, E., Serrano, A., Pavon, F. J., Parsons, L. H., Maldonado, R., et al. (2014). The systemic administration of oleylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 17, 455–468. doi: 10.1017/S1461145713001259
- Hasanein, P., and Teimuri Far, M. (2015). Effects of URB597 as an inhibitor of fatty acid amide hydrolase on WIN55, 212-2-induced learning and memory deficits in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 131, 130–135. doi: 10.1016/j.pbb.2015.02.007
- Heberlein, A., Muschler, M., Wilhelm, J., Frieling, H., Lenz, B., Gröschl, M., et al. (2010). BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 34, 1060–1064. doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.05.025
- Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 609–642. doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161629
- Iversen, L. (2003). Cannabis and the brain. *Brain* 126, 1252–1270. doi: 10.1093/brain/awg143
- Joe, K. H., Kim, Y. K., Kim, T. S., Roh, S. W., Choi, S. W., Kim, Y. B., et al. (2007). Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 31, 1833–1838. doi: 10.1111/j.1530-0277.2007.00507.x
- Knob, R., Singec, I., Ditter, M., Pantazis, G., Capetian, P., Meyer, R. P., et al. (2010). Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years. *PLoS One* 5:e8809. doi: 10.1371/journal.pone.0008809
- Li, Y., and Kim, J. (2016). CB2 cannabinoid receptor knockout in mice impairs contextual long-term memory and enhances spatial working memory. *Neural Plast.* 2016:9817089. doi: 10.1155/2016/9817089
- Lu, B., Nagappan, G., and Lu, Y. (2014). BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. *Handb. Exp. Pharmacol.* 220, 223–250. doi: 10.1007/978-3-642-45106-5_9
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., et al. (2002). The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418, 530–534. doi: 10.1038/nature00839
- Martín-Moreno, A. M., Brera, B., Spuch, C., Carro, E., García-García, L., Delgado, M., et al. (2012). Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg APP 2576 mice. *J. Neuroinflammation* 16:8. doi: 10.1186/1742-2094-9-8
- Mazzola, C., Medalie, J., Scherma, M., Panlilio, L. V., Solinas, M., Tanda, G., et al. (2009). Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR-alpha nuclear receptors. *Learn. Mem.* 16, 332–337. doi: 10.1101/lm.1145209
- McCullough, L. D., de Vries, G. J., Miller, V. M., Becker, J. B., Sandberg, K., and McCarthy, M. M. (2014). NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy, implementation, and metrics. *Biol. Sex Differ.* 5:15. doi: 10.1186/s13293-014-0015-5
- Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., et al. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 25, 554–560. doi: 10.1038/s41591-019-0375-9
- Murphy, M., Mills, S., Winstone, J., Leishman, E., Wager-Miller, J., Bradshaw, H., et al. (2017). Chronic adolescent $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol treatment of male mice leads to long-term cognitive and behavioral dysfunction, which are prevented by concurrent cannabidiol treatment. *Cannabis Cannabinoid Res.* 2, 235–246. doi: 10.1089/can.2017.0034
- NIAAA (2004). National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism Council approves definition of binge drinking. *NIAAA Newsl.lett.* 3:3.
- Nixon, K., and Crews, F. T. (2004). Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J. Neurosci.* 24, 9714–9722. doi: 10.1523/jneurosci.3063-04.2004
- Nookala, A. R., Schwartz, D. C., Chaudhari, N. S., Glazyrin, A., Stephens, E. B., Berman, N. E. J., et al. (2018). Methamphetamine augment HIV-1 Tat mediated memory deficits by altering the expression of synaptic proteins and neurotrophic factors. *Brain Behav. Immun.* 71, 37–51. doi: 10.1016/j.bbi.2018.04.018
- Orio, L., Pavón, F. J., Blanco, E., Serrano, A., Araos, P., Pedraz, M., et al. (2013). Lipid transmitter signaling as a new target for treatment of cocaine addiction: new roles for acylethanolamides and lysophosphatidic acid. *Curr. Pharm. Des.* 19, 7036–7049. doi: 10.2174/138161281940131209143421
- Paxinos, G., and Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th edn. Sydney: Academic Press.
- Pertwee, R. G. (2001). Cannabinoid receptors and pain. *Prog. Neurobiol.* 63, 569–611.
- Pilatti, A., Read, J. P., and Pautassi, R. M. (2017). ELSA 2016 Cohort: alcohol, tobacco, and marijuana use and their association with age of drug use onset, risk perception, and social norms in Argentinean college freshmen. *Front. Psychol.* 8:1452. doi: 10.3389/fpsyg.2017.01452
- Piomelli, D., Tarzia, G., Duranti, A., Tontini, A., Mor, M., Compton, T. R., et al. (2006). Pharmacological profile of the selective FAAH inhibitor KDS-4103 (URB597). *CNS Drug Rev.* 12, 21–38. doi: 10.1111/j.1527-3458.2006.00021.x
- Reynolds, P. M., Mueller, S. W., and MacLaren, R. (2015). A comparison of dexmedetomidine and placebo on the plasma concentrations of NGF, BDNF, GDNF, and epinephrine during severe alcohol withdrawal. *Alcohol* 49, 15–19. doi: 10.1016/j.alcohol.2014.11.006
- Rivera, P., Arrabal, S., Cifuentes, M., Grondona, J. M., Pérez-Martín, M., Rubio, L., et al. (2014). Localization of the cannabinoid CB1 receptor and the 2-AG synthesizing (DAGL α) and degrading (MAGL, FAAH) enzymes in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Front. Neuroanat.* 8:56. doi: 10.3389/fnana.2014.00056
- Rivera, P., Bindila, L., Pastor, A., Pérez-Martín, M., Pavón, F. J., Serrano, A., et al. (2015). Pharmacological blockade of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) alters neural proliferation, apoptosis and gliosis in the rat hippocampus, hypothalamus and striatum in a negative energy context. *Front. Cell Neurosci.* 9:98. doi: 10.3389/fncel.2015.00098
- Rivera, P., Fernández-Arjona, M. D. M., Silva-Peña, D., Blanco, E., Vargas, A., López-Ávalos, M. D., et al. (2018). Pharmacological blockade of fatty acid amide hydrolase (FAAH) by URB597 improves memory and changes the phenotype of hippocampal microglia despite ethanol exposure. *Biochem. Pharmacol.* 157, 244–257. doi: 10.1016/j.bcp.2018.08.005
- Rivera, P., Pérez-Martín, M., Pavón, F. J., Serrano, A., Crespillo, A., Cifuentes, M., et al. (2013). Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One* 8:e64750. doi: 10.1371/journal.pone.0064750
- Ronca, R. D., Myers, A. M., Ganea, D., Tuma, R. F., Walker, E. A., and Ward, S. J. (2015). A selective cannabinoid CB2 agonist attenuates damage and improves

- memory retention following stroke in mice. *Life Sci.* 138, 72–77. doi: 10.1016/j.lfs.2015.05.005
- Roskoski, R. Jr. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol. Res.* 66, 105–143. doi: 10.1016/j.phrs.2012.04.005
- Sanchez-Marin, L., Pavon, F. J., Decara, J., Suarez, J., Gavito, A., Castilla-Ortega, E., et al. (2017). Effects of intermittent alcohol exposure on emotion and cognition: a potential role for the endogenous cannabinoid system and neuroinflammation. *Front. Behav. Neurosci.* 11:15. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00015
- Segal-Gavish, H., Gazit, N., Barhum, Y., Ben-Zur, T., Taler, M., Hornfeld, S. H., et al. (2017). BDNF overexpression prevents cognitive deficit elicited by adolescent cannabis exposure and host susceptibility interaction. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2462–2471. doi: 10.1093/hmg/ddx139
- Sihag, J., and Jones, P. J. H. (2018). Oleoylethanolamide: the role of a bioactive lipid amide in modulating eating behaviour. *Obes. Rev.* 19, 178–197. doi: 10.1111/obr.12630
- Silva-Peña, D., Garcia-Marchena, N., Alen, F., Araos, P., Rivera, P., Vargas, A., et al. (2018). Alcohol-induced cognitive deficits are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. *Addict. Biol.*
- Sipe, J. C., Chiang, K., Gerber, A. L., Beutler, E., and Cravatt, B. F. (2002). A missense mutation in human fatty acid amide hydrolase associated with problem drug use. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 8394–8399. doi: 10.1073/pnas.082235799
- Solowij, N., and Battisti, R. (2008). The chronic effects of cannabis on memory in humans: a review. *Curr. Drug Abuse Rev.* 1, 81–98. doi: 10.2174/1874473710801010081
- Steel, R. W., Miller, J. H., Sim, D. A., and Day, D. J. (2011). Learning impairment by $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol in adolescence is attributable to deficits in chunking. *Behav. Pharmacol.* 22, 837–846. doi: 10.1097/FBP.0b013e32834dbbb1
- Steel, R. W., Miller, J. H., Sim, D. A., and Day, D. J. (2014). Delta-9-tetrahydrocannabinol disrupts hippocampal neuroplasticity and neurogenesis in trained, but not untrained adolescent Sprague-Dawley rats. *Brain Res.* 1548, 12–19. doi: 10.1016/j.brainres.2013.12.034
- Suliman, N. A., Taib, C. N. M., Moklas, M. A. M., and Basir, R. (2018). Delta-9-tetrahydrocannabinol ($\Delta(9)$ -THC) induce neurogenesis and improve cognitive performances of male Sprague Dawley rats. *Neurotox. Res.* 33, 402–411. doi: 10.1007/s12640-017-9806-x
- Varvel, S. A., and Lichtman, A. H. (2005). “Role of the endocannabinoid system in learning and memory,” in *Cannabinoids as Therapeutics. Milestones in Drug Therapy*, ed. R. Mechoulam (Basel: Birkhauser).
- Wegener, N., Kuhnert, S., Thüns, A., Roese, R., and Koch, M. (2008). Effects of acute systemic and intra-cerebral stimulation of cannabinoid receptors on sensorimotor gating, locomotion and spatial memory in rats. *Psychopharmacology* 198, 375–385. doi: 10.1007/s00213-008-1148-1
- Wise, L. E., Thorpe, A. J., and Lichtman, A. H. (2009). Hippocampal CB(1) receptors mediate the memory impairing effects of delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Neuropsychopharmacology* 34, 2072–2080. doi: 10.1038/npp.2009.31
- Wu, J., Bie, B., Yang, H., Xu, J. J., Brown, D. L., and Naguib, M. (2013). Activation of the CB2 receptor system reverses amyloid-induced memory deficiency. *Neurobiol. Aging* 34, 791–804. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.011
- Yang, L. C., Guo, H., Zhou, H., Suo, D. Q., Li, W. J., Zhou, Y., et al. (2015). Chronic oleoylethanolamide treatment improves spatial cognitive deficits through enhancing hippocampal neurogenesis after transient focal cerebral ischemia. *Biochem. Pharmacol.* 94, 270–281. doi: 10.1016/j.bcp.2015.02.012
- Zanettini, C., Panlilio, L. V., Alicki, M., Goldberg, S. R., Haller, J., and Yasar, S. (2011). Effects of endocannabinoid system modulation on cognitive and emotional behavior. *Front. Behav. Neurosci.* 5:57. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00057
- Zhao, Y., Liu, Y., Jing, Z., Peng, L., Jin, P., Lin, Y., et al. (2018). N-oleoylethanolamide suppresses intimal hyperplasia after balloon injury in rats through AMPK/PPAR α pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 496, 415–421. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.015
- Zhou, Y., Yang, L., Ma, A., Zhang, X., Li, W., Yang, W., et al. (2012). Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology* 63, 242–249. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.03.008

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

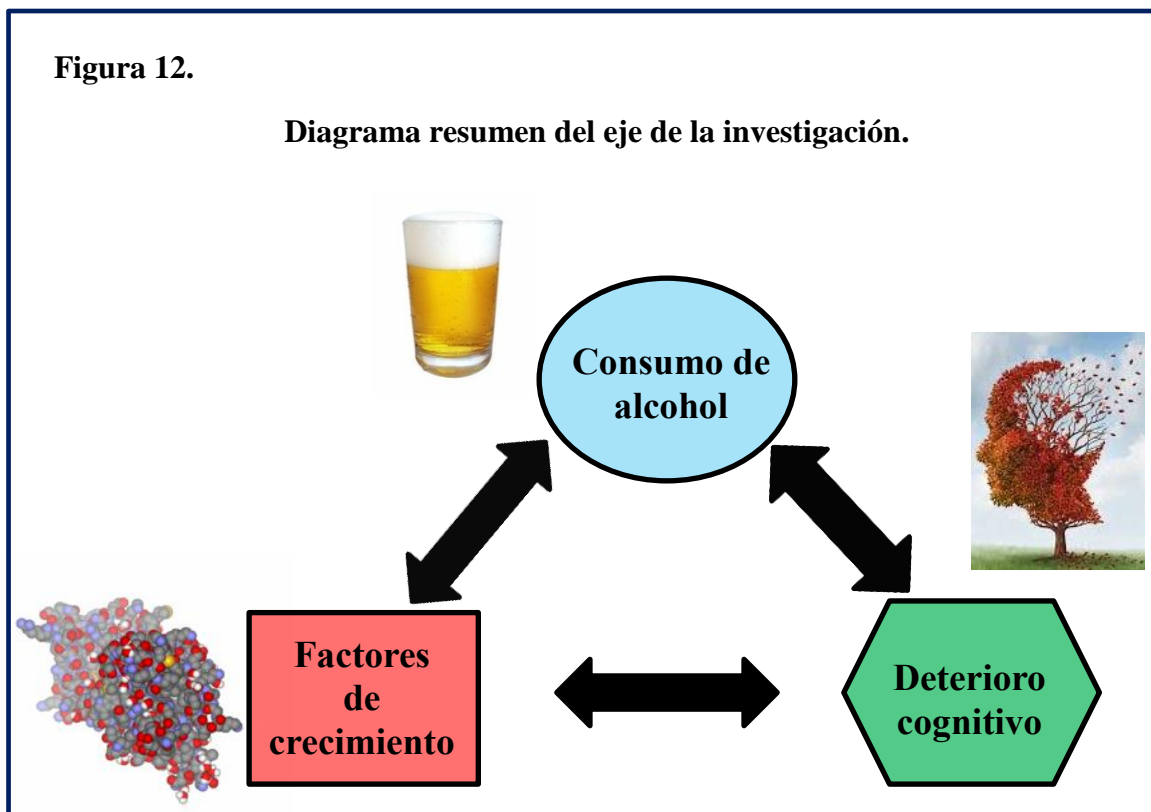
Copyright © 2019 Silva-Peña, Rivera, Alén, Vargas, Rubio, García-Marchena, Pavón, Serrano, Rodríguez de Fonseca and Suárez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5. Discusión

5.1. Consumo de alcohol, factores neurotróficos y deterioro cognitivo: Hallazgos principales.

Existe un amplio abanico de estudios que profundizan en la relación entre consumo de alcohol y factores tróficos. Existe también extensa información sobre la relación entre deterioro cognitivo y alcohol, y sobre deterioro cognitivo y factores tróficos. No obstante, la literatura científica actual presenta un enorme vacío a la hora de estudiar estas tres importantes variables al mismo tiempo, pese a que están íntimamente conectadas y son temas de gran importancia en la actualidad. Como hemos desarrollado detalladamente en la introducción:

- El alcohol es consumido ampliamente a lo largo de todo el mundo.
- Los factores tróficos se posicionan como moléculas fundamentales en multitud de procesos del sistema nervioso.
- El deterioro cognitivo está considerado como uno de los principales retos sanitarios del siglo XXI.



Por ello, nosotros hemos querido introducirnos de lleno en el estudio de estas tres variables, ver de qué manera se ven afectadas entre sí y si es posible obtener algún beneficio terapéutico de su estudio avanzado. Estos estudios están reforzados por el hecho de que se ha podido establecer recientemente una asociación muy clara entre alcohol y riesgo de demencia (incremento del 17% de progresión a demencia), en cohortes seguidas durante más de 20 años (148).

Estos han sido nuestros hallazgos principales:

Estudio 1:

- Las concentraciones plasmáticas de BDNF e IGF-1 están disminuidas en los pacientes con TUA.
- En el grupo control, la edad presenta una correlación negativa significativa con los niveles de IGF-1, pero esta asociación no aparece en el grupo alcohol.
- Los pacientes con TUA y patología hepática comórbida presentan niveles de BDNF aún menores que los pacientes con TUA sin patología hepática.
- No hemos encontrado asociaciones significativas entre IGF-1, IGF-1R o BDNF respecto a la comorbilidad psiquiátrica, lo que puede suponer un punto positivo a nuestro estudio al añadir especificidad a estas moléculas como posibles biomarcadores de deterioro cognitivo y consumo, ya que no habría interacción con otras patologías psiquiátricas.

Estudio 2:

- Los niveles de BDNF, NT-3 e IGF-2 están disminuidos en los pacientes con TUA.
- Los deficientes resultados de las pruebas de evaluación neuropsicológica (Test FAB y MFE) de los pacientes con TUA indican que las funciones ejecutivas y de memoria están deterioradas.
- Existe una correlación positiva significativa entre las concentraciones de BDNF y las puntuaciones FAB. No obstante, no se encontró correlación entre NT-3 y las puntuaciones FAB.
- En pacientes con TUA el nivel educativo elevado supone un importante factor protector frente al deterioro cognitivo.

- En el modelo preclínico, los niveles plasmáticos de NT-3 y BDNF también están disminuidos en los animales con consumo de alcohol continuado.
- El consumo de alcohol provoca una hipoactivación del sistema de señalización de BDNF en el hipocampo, disminuyendo la presencia de ERK fosforilada respecto a ERK total y reduciendo la expresión de factores neurogénicos.

Estudio 3

- El consumo de alcohol tipo “Binge” también provoca la disminución de los niveles plasmáticos de BDNF.
- La administración de OEA y THC revierten parcialmente la disminución de BDNF provocada por el consumo de alcohol, mientras que la administración concomitante de dichas sustancias tiene un efecto sinérgico que restablece totalmente los niveles normales de BDNF.
- El consumo tipo Binge de alcohol acompañado de OEA o THC, provoca una hipoactivación del sistema de señalización de BDNF en el hipocampo, disminuyendo la presencia de ERK fosforilada respecto a ERK total y reduciendo la expresión de factores neurogénicos.
- En respuesta al consumo de alcohol y THC, la OEA desarrolla un papel de regulación en la memoria espacial a corto plazo y la neurogénesis hipocampal a través del sistema de señalización BDNF/AKT/ERK2.

5.2. Factores tróficos y comorbilidad psiquiátrica.

En el primer artículo, se analiza el efecto del alcohol sobre determinados factores tróficos y su posible influencia sobre los trastornos comórbidos psiquiátricos. Esto es importante para nuestro estudio, ya que la presencia de algún tipo de patología psiquiátrica podría tener una clara repercusión a su vez en el deterioro cognitivo. Numerosos trabajos han señalado que los factores de crecimiento pueden representar un papel importante en los trastornos psiquiátricos. Por ejemplo, las concentraciones de BDNF se ven disminuidas en trastornos de ansiedad y depresión (110) (111) mientras que otros estudios apuntan a que IGF-1 está relacionado con la etiología de la depresión (112), particularmente con problemas de aprendizaje y memoria, correlacionando con fatiga, tensión y ansiedad (113) (114). En nuestra cohorte de pacientes con TUA, encontramos una elevada prevalencia de comorbilidad tanto psiquiátrica como por uso de otras sustancias, pero no encontramos ninguna asociación entre las concentraciones

plasmáticas de nuestras moléculas de estudio, BDNF, IGF-1 e IGFBP-3, y el diagnóstico de comorbilidad psiquiátrica. Cabe destacar que entre las posibles patologías psiquiátricas comórbidas analizadas no se incluyó el TNC, ya que la demencia constituía un criterio de exclusión en este primer trabajo, al poder interferir en el diagnóstico y la detección de otras patologías comórbidas. El deterioro cognitivo en una cohorte humana sería estudiado en profundidad en el segundo artículo, como veremos más adelante. Una limitación importante de este estudio, sin embargo, es el hecho de que la población con AUD reclutada no tuviera una representación de pacientes mayores de 65 años, por lo que el impacto del envejecimiento en estos marcadores no pudo constatarse correctamente, y esto podría repercutir en patologías comórbidas como la depresión o el deterioro cognitivo. El hecho de que no se encontraran asociaciones significativas entre factores tróficos y comorbilidad psiquiátrica supone un aliciente para nuestro estudio, añadiendo especificidad a estas moléculas como posibles biomarcadores de deterioro cognitivo y consumo, eliminando la opción de la interacción con otras patologías psiquiátricas, tan comunes en los trastornos por uso de sustancias.

Por otro lado, en este primer artículo ya se detecta un dato de capital importancia en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral: la disminución en la concentración plasmática de BDNF tras el uso patológico de alcohol incluso después de una abstinencia mantenida. BDNF es la molécula principal en este trabajo, por lo que ha sido evaluada en todos los experimentos. Los niveles de BDNF se han visto disminuidos en cada uno de nuestros estudios, tanto en humanos como en animales, ya sea en consumo continuado o en atracón.

5.3. BDNF y consumo de alcohol.

Aunque es necesario seguir aportando información sobre BDNF y su comportamiento en situaciones de consumo nocivo de alcohol, esta molécula ha sido ampliamente investigada, por lo que existen cientos de resultados diferentes al respecto. Ciertamente, los mecanismos de regulación de los niveles de neurotrofinas responden a un sistema muy complejo dependiente de múltiples variables, lo que implica que los niveles de BDNF estén fuertemente influidos por diversos factores, tales como el tiempo de exposición al alcohol, la graduación de la bebida, el estrés, el tiempo de abstinencia, los patrones de consumo, edad de inicio al consumo, etc. Esta variabilidad genera

discrepancias o “alteraciones dinámicas” que son difíciles de interpretar y arrojan la cuestión de si realmente BDNF puede ser un biomarcador fiable de enfermedades psiquiátricas como el trastorno por uso de sustancias. Varios autores explican las variaciones de BDNF por el uso de diferentes medicaciones psiquiátricas, como pueden ser antidepresivos y benzodiazepinas (115), muy frecuentes en los pacientes con trastorno por uso de sustancias (como puede verse en el estudio 1 de esta tesis). Sin embargo, existe también cierto consenso acerca de que el consumo de alcohol está asociado a una disminución en los niveles de BDNF (116), idea que además ratifican nuestros estudios. Sin embargo, hemos encontrado también varios artículos que analizan las concentraciones de BDNF en condiciones diferentes y teniendo en cuenta ciertas variables que nosotros no incluimos y omitiendo algunas que sí tenemos en cuenta, generando un intenso debate sobre el efecto concreto de la ingesta de alcohol sobre los niveles de BDNF. Por ejemplo, un estudio realizado en 2010 (115) expone que los niveles de BDNF se mantienen tras la abstinencia, mientras que otros trabajos (117) apuntan a una disminución de BDNF. Otros autores (118) (119), exponen que la retirada de alcohol genera un aumento en las concentraciones plasmáticas de BDNF. No obstante, en todos estos estudios el tiempo de abstinencia no supera los 14 días, mientras que como vimos en el apartado metodología, el criterio de inclusión a nuestros estudios exigía un mínimo de 30 días de abstinencia, siendo la media de abstinencia de los pacientes de nuestros estudios claramente mayor (4,3 meses). Del análisis exhaustivo de la bibliografía actual, concluimos que, en etapas tempranas tras el inicio de la abstinencia, los mecanismos internos de autorregulación del individuo podrían estar sobreactivados, por lo que los niveles de factores tróficos serían muy inestables, lo que daría lugar a la gran variedad de resultados existentes respecto a las concentraciones de BDNF. Sin embargo, en condiciones de abstinencia mantenida en un período largo de tiempo, los niveles plasmáticos de BDNF permanecen disminuidos.

Sin embargo, en abstinencias a largo plazo, BDNF parece estar disminuido. De acuerdo con nuestros trabajos, un estudio previo informó de que aquellos pacientes hospitalizados por más de 30 días para disminuir los efectos nocivos derivados del consumo de alcohol mostraron una disminución en los niveles de BDNF (120). Además, en este estudio se controlaba la variable de la medicación psiquiátrica y ninguno de los pacientes estaba tomando ningún tipo de medicación psicoactiva en el momento del estudio. Es importante destacar que, a diferencia de nuestro trabajo, ninguno de estos estudios controlaba variables de tipo social como el nivel educativo, lo

cual es un dato de gran relevancia ya que se ha demostrado que los factores sociales juegan un papel trascendental en los niveles plasmáticos de neurotrofinas (121). Es importante tener en cuenta también que nuestro diseño no permite descartar otros procesos que concurrentemente pudieran afectar al declinar de las concentraciones de BDNF y tener impacto sobre el deterioro cognitivo. Es muy posible que factores neurológicos que potencialmente disminuyesen la concentración de BDNF (i.e. aquellos que conducen a deterioro cognitivo que evolucionaría a una demencia tipo Alzheimer con el tiempo) tuviesen efecto sinérgico con el alcohol a la hora de incrementar el deterioro. Al no tener población envejecida, tanto de AUD como controles, no hemos podido comprobar este hecho.

En cualquier caso, a pesar de todas las variables que se han expuesto que pueden afectar a las concentraciones plasmáticas de neurotrofinas, nuestros estudios afirman rotundamente que BDNF permanece disminuido en la exposición crónica a alcohol tras la abstinencia a largo plazo.

5.4. Deterioro cognitivo y alcohol: nivel educativo y otros factores sociodemográficos.

A la hora de analizar el posible deterioro cognitivo de una población es importante tener en cuenta ciertos factores socio demográficos, como pueden ser la edad, el índice de masa corporal, el sexo, o el nivel educativo.

Tabla 3.

Datos socio demográficos (Población Estudio 2)

| Variable | | TUA (N=58) | Control (N=22) | Valor p |
|---|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| Edad [Media (SD)] | Años | 49.22 (8.20) | 47.27 (10.73) | 0.516 ^a |
| IMC [Mean (SD)] | Kg/m ² | 25.86 (3.81) | 26.51 (3.50) | 0.865 ^a |
| Sexo [N(%)] | Mujeres Hombre | 10 (17.2) 48 (82.8) | 3 (13.6) 19 (86.4) | 0.494 ^b |
| Educación [N(%)] | Primaria Secundaria Universidad | 26 (43.1) 23 (39.65) 9 (15.51) | 3 (13.63) 6 (27.27) 13 (59.09) | <0.001 ^b |
| FAB test [Media (SD)] | Puntuación | 14.68 (2.65) | 17.04 (1.17) | <0.001 ^a |
| MFE test^c [Media (SD)] | Puntuación | 31.29 (17.67) | 13.9 (13.31) | <0.001 ^a |

¹Abreviaturas: TUA, Trastorno por Uso de Alcohol; IMC, Índice de masa corporal; FAB, frontal assessment battery; MFE, memory failures everyday. Estadísticos: ^avalor p del test T de Student, ^bvalor p del test exacto de Fisher, ^cUna puntuación mayor en el test MFE indica un peor desempeño de la prueba.

Adaptado del Estudio 2 de la presente Tesis Doctoral. (Silva-Peña et al., 2018)

Como se puede ver en la tabla, el grupo de pacientes con TUA presenta una clara deficiencia cognitiva respecto al grupo control.

Nuestra población presentaba un equilibrio entre controles y pacientes en todas las variables enumeradas, no existiendo diferencias significativas para ninguna de ellas exceptuando el nivel educativo. Cabe destacar que la proporción de mujeres en el estudio fue muy inferior a la de los hombres, lo que indica una menor prevalencia de TUA diagnosticados en las mujeres. Teniendo este dato en cuenta, los controles se seleccionaron en igual proporción, equilibrando los porcentajes de ambos sexos entre grupos.

Como hemos mencionado, la distribución de nivel educativo entre el grupo control y el grupo pacientes presenta desigualdades, ya que el grupo control tiene mayor nivel educativo medio, lo cual describe una realidad social de nuestro país: un nivel educativo bajo está relacionado con una mayor prevalencia de trastornos por uso de sustancias.

Esto podría suponer un problema a la hora de valorar nuestros datos pero, lejos de ser una limitación en el estudio, nos arroja datos muy interesantes. Al analizar individualmente cada grupo de nivel educativo, comprobamos que en todos ellos el grupo control supera al grupo pacientes en la puntuación obtenida en el test. Es decir, al coger solo individuos del mismo nivel educativo, hacemos que este ya no sea un factor diferencial y las desigualdades en las puntuaciones FAB se mantienen: los sujetos sanos presentan puntuaciones FAB claramente mayores, independientemente del nivel educativo (Ver tabla 4).

Al estudiar por separado las cohortes en función de si pertenecen al grupo control o al grupo AUD, encontramos también datos interesantes. En el grupo AUD, las puntuaciones FAB aumentan proporcionalmente al aumento de nivel educativo de forma significativa. Sin embargo, al tomar solo los individuos sanos y dividirlos por nivel educativo, no hay diferencias. Por todo esto, podemos afirmar que el factor determinante en el deterioro cognitivo de nuestra población es el consumo de alcohol. Además, la puntuación FAB del grupo de nivel educativo más alto de los pacientes no

llega a ser superior a la puntuación FAB del grupo de nivel educativo más bajo del grupo control. Por todo esto, el consumo de alcohol es la variable que explica el deterioro cognitivo y no el nivel educativo.

Tabla 4.

Puntuación FAB según nivel educativo (Población Estudio 2)

| FAB [Media (SD), N] | Nivel educativo | | | ANOVA |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------|--|
| | Nivel 1 | Nivel 2 | Nivel 3 | |
| Control | 17.66 (0.57), 3 | 16.6 (1.03), 6 | 17.07 (1.32), 13 | $F_{2,21} = 0.71$ $p = 0.501$ |
| TUA | 13.76 (3.16), 26 | 15.17 (1.99), 23 | 16.11 (1.53), 9 | $F_{2,55} = 3.51$ $p = 0.037$ |
| Test t de student | $p = 0.046$ | $p = 0.023$ | $p = 0.13$ | |

Tabla explicativa de las puntuaciones FAB obtenidas por cada grupo en función de su nivel educativo y las diferencias estadísticas entre los grupos (aquellos grupos donde la diferencia es significativa están resaltados en negrita).

Adaptado del Estudio 2 de la presente Tesis Doctoral. (Silva-Peña et al. 2018)

Sin embargo, en el grupo pacientes, el nivel educativo sí puede ser un factor protector que enmascare los problemas cognitivos asociados al consumo, ya que en este grupo sí se observa una disminución de las capacidades cognitivas cuando el nivel educativo es menor.

En pocas palabras, el grupo control muestra un nivel educativo mayor que el grupo AUD, lo cual no deja de ser un dato relevante a nivel sociodemográfico. Al analizar los grupos por separado, en el grupo AUD un nivel educativo mayor se relaciona con una mayor puntuación FAB, mientras que en el grupo control la puntuación FAB permanece estable a través de los diferentes niveles educativos. Estos resultados sugieren que una persona sana debería obtener una puntuación elevada, independientemente de su nivel educativo. Sin embargo, en el grupo AUD el nivel educativo juega un papel protector contra el deterioro cognitivo.

Respecto a la edad, y como hemos discutido antes, se sabe que el BDNF disminuye con el envejecimiento normal. Sería muy interesante poder estudiar si esta disminución asociada a la edad se acelera por los antecedentes de consumo de alcohol, y comprobar si el deterioro normal se refleja en las concentraciones de BDNF, mostrando una sinergia con los efectos del alcohol. Para ello sería necesario tener una representación más elevada de individuos jóvenes con diagnóstico de abuso de alcohol, y de adultos envejecidos (mayores de 65 años) con historial de AUD en los que poder comprobar esta hipótesis.

5.5. Otros factores tróficos relacionados con el consumo de alcohol: NT-3, IGF-1, IGF-2, IGFBP-3.

En cada uno de los experimentos se analizan además diversos factores de crecimiento implicados en la supervivencia y desarrollo de las células que forman el sistema nervioso. Entre ellos, otros factores de crecimiento nervioso, como el NT-3, y otros factores de crecimiento de tipo insulínico, como IGF-1, IGF-2 e IGFBP-3.

En el Estudio 1, analizamos las concentraciones de IGF-1 y de su proteína de unión, IGFBP-3, debido a que esta molécula juega un papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central, la modulación de la neuroplasticidad y los efectos comportamentales derivados de la toxicidad inducida por alcohol (122), (123), (124). Como podemos ver en la figura 1 del estudio 1, IGF-1 está disminuido significativamente en el grupo alcohol. Esta situación ha sido descrita en estudios previos, en los que se expone una asociación entre el abuso crónico de alcohol y una inhibición en la biodisponibilidad de IGF-1 (125). Sin embargo, IGFBP-3 no presenta alteraciones significativas.

Los factores de crecimiento juegan un papel fundamental en el mantenimiento de las condiciones homeostáticas del sistema nervioso central en edades avanzadas (126). La actividad neuroprotectora de los factores de crecimiento ha sido extensamente estudiada, y la evidencia científica actual apunta que la expresión de péptidos tales como IGF-1 se relacionan con la longevidad (127). Además, la función de IGF-1 está disminuida en el cerebro con la edad (128). En nuestro experimento no se detectó asociación entre los niveles plasmáticos de IGF-1 y la edad en los pacientes con trastorno por uso de alcohol.

Existen estudios que revelan que los niveles circulantes de IGF-1 afectan también significativamente a la función cerebral cognitiva y están reducidos en edades avanzadas (129). Nuestros datos aportan que los sujetos con un consumo crónico de alcohol (13 años de uso problemático) muestran niveles menores de IGF-1 que los sujetos control en el mismo rango de edad. Estos hallazgos concuerdan con el hecho de que un consumo crónico de alcohol induce deterioro cognitivo (130).

Se analizaron también los niveles de IGF-2, como factor de crecimiento similar a IGF-1 pero estructuralmente diferente a las neurotrofinas. IGF-2 mostró una reducción en la concentración plasmática de los pacientes con TUA, pero no se detectó correlación alguna entre las puntuaciones de cognición y los niveles de esta proteína, ni en la muestra total ni en los grupos independientes, tal y como puede verse en la Tabla 3 del Estudio 2.

Por otro lado, también quisimos estudiar NT-3, aunque en menor profundidad, como molécula similar a BDNF. Los niveles de NT-3 también se encuentran disminuidos en los pacientes alcohólicos. Aunque NT-3 también tiene un papel importante en mantener la supervivencia neuronal y el funcionamiento del cerebro adulto, entendemos que su rol es similar a BDNF al compartir gran parte de la ruta de señalización, pero con un peso menor que dicha molécula en respuesta a un contexto alcohólico. Sin embargo, consideramos que no se ha de subestimar el papel adaptativo de NT-3 en los mecanismos subyacentes al aprendizaje y la memoria, tal y como previamente sugirieron los estudios de Szabo y Hoffman (131). Por otra parte, en un futuro consideraremos profundizar en la investigación de las interacciones entre los niveles de NT-3 con variables metabólicas y de género. Un estudio reciente (132) indicó que los niveles de NT-3 correlacionaron con el índice de masa corporal y los perfiles lipoproteicos en pacientes con intoxicación alcohólica. Respecto a esto, consideramos nuestros avances en NT-3 e IGF-2 como la base para futuros estudios de correlación entre NT-3, IGF-2, parámetros metabólicos y de hepatotoxicidad en pacientes con TUA.

5.6. Efecto del consumo de alcohol en el hipocampo: estudio preclínico.

Tras desarrollar extensamente las alteraciones de BDNF en situaciones de consumo prolongado de alcohol, quisimos profundizar en la cascada de señalización de BDNF y

sus niveles de expresión génica en el hipocampo, una región ampliamente relacionada con la memoria y el aprendizaje.

Para ello, empleamos los modelos animales “*four bottle choice*” y “*binge drinking*” descritos en el apartado Metodología y desarrollados en los estudios 2 y 3 respectivamente. En el Estudio 2 se detectó una disminución de los niveles de ARN mensajero de los factores neurogénicos en el hipocampo de las ratas expuestas a alcohol. Este hallazgo indica que existe una acción negativa del alcohol sobre estos factores de crecimiento, cuyo sistema de señalización también está alterado, tal y como revela el análisis de expresión proteica. Este análisis muestra una disminución en los niveles de proteína ERK2 fosforilada y de su respuesta transcripcional a los factores neurogénicos *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam* y *Calb1*. Por otro lado, las ratas expuestas a alcohol presentaron un deterioro cognitivo que correlaciona con alteraciones de BDNF inducida por alcohol. Los niveles hipocampales de ARN mensajero para *Bdnf* presentaron una correlación negativa con el índice de discriminación de la prueba de reconocimiento de objetos, lo que indica una peor funcionalidad en la memoria. Este dato concuerda con los efectos adversos de la ausencia específica del gen *BDNF* en el hipocampo dorsal (133) (134). En dichos estudios se evaluó la memoria declarativa mediante el reconocimiento de objetos y el aprendizaje espacial mediante el laberinto acuático. Además, la administración de BDNF recombinante en el hipocampo de ratones promueve un mejor desempeño en tareas de memoria espacial y presenta efectos a largo plazo en comportamientos emocionales (135).

La señalización mediada por BDNF y su receptor principal, TRKb, está asociada con trastornos por uso de alcohol y cocaína (115) (136) (137), así como con varios trastornos psiquiátricos entre los que se incluye depresión, esquizofrenia y ansiedad (138) (139) (140) (141). Al observar en 2017 que según nuestros resultados los niveles de BDNF estaban específicamente reducidos en los pacientes con TUA con déficits cognitivos frontales o de memoria, tratamos de confirmar esta tendencia en un modelo animal. Efectivamente, esta asociación se confirmó en el experimento de exposición voluntaria a alcohol en ratas adolescentes, ya que se encontró una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de BDNF y la memoria de reconocimiento del objeto familiar. Además, pudimos profundizar en el análisis de este hecho estudiando el efecto en el cerebro de los animales. Descubrimos una correlación negativa entre la

expresión de ARN mensajero de *Bdnf* hipocampal y la memoria de reconocimiento del objeto nuevo.

Siguiendo con esta línea, encontramos en nuestro modelo animal una reducción específica de los niveles de proteína ERK2 fosforilada. El deterioro en la regulación de BDNF y en la señalización de ERK2 intracelular, implica la desactivación de las cascadas de señalización y sus acciones transcripcionales, lo que da lugar a una reducción inducida por alcohol de la respuesta neurogénica mediada por ERK. Otros autores sostienen también esta idea (142).

Finalmente, y manteniendo la coherencia con los resultados descritos anteriormente, detectamos una regulación a la baja de los niveles de expresión de mRNA en *Mki67*, *Sox2*, *Dcx*, *Ncam* y *Calb1* en el hipocampo de las ratas expuestas a alcohol. Estos factores, fuertemente relacionados con la neurogénesis, están implicados además en el correcto funcionamiento del hipocampo, ya que afectan a la proliferación celular, el mantenimiento de las células neuronales y sus precursores, el crecimiento neuronal y la plasticidad sináptica (143). Por todo ello, y sin olvidar que el hipocampo es una de las regiones cerebrales más implicadas en los procesos de memoria, el estudio del BDNF adquiere una relevancia más que significativa.

5.7. Efecto de ciertas sustancias exógenas sobre el sistema de señalización de neurotrofinas: OEA y THC.

Continuando con esta línea, quisimos examinar el efecto que pudiera tener la administración de ciertas sustancias que activaran mecanismos relacionados con las neurotrofinas.

Si bien OEA y THC no son en absoluto moléculas desconocidas, sí lo es su asociación con BDNF y alcohol. En la actualidad, apenas se encuentran artículos que integren OEA, THC, BDNF y alcohol, a pesar de que su relación es evidente. En cualquier caso, la escasa bibliografía actual apunta al incremento en los niveles de BDNF tras el tratamiento crónico con OEA (144). Además, estudios acerca de la influencia del THC sobre BDNF indican igualmente un aumento en los niveles de BDNF tras administración de THC a diferentes dosis, tanto en animales (145) como en humanos (146). Todos ellos concuerdan con nuestros resultados, ya que en el estudio 3 de esta

Tesis, las concentraciones plasmáticas de BDNF en rata mostraron estar claramente disminuidas por el consumo de alcohol, pero OEA y THC revirtieron parcialmente la disminución de BDNF provocada por el consumo de alcohol, mientras que la administración conjunta de dichas sustancias presentó un efecto sinérgico que restableció totalmente los niveles de BDNF, igualándolos a los del grupo control.

A nivel hipocampal, los niveles de BDNF se vieron claramente disminuidos por la administración de THC y, a diferencia de lo que sucede a nivel plasmático, la administración concomitante de OEA no revirtió este efecto. Curiosamente, el perfil gráfico de los niveles de TRKb mostró ser exactamente el opuesto al de BDNF. Esta desregulación entre los niveles de BDNF y TRKb podría deberse a un mecanismo homeostático de compensación, disminuyendo la demanda de agonista debido a la sobreexpresión de receptor.

Además, los niveles de ARN mensajero de NT-3 también se vieron disminuidos por la administración de OEA y THC. Esta reducción a nivel de expresión génica en dichos factores de crecimiento se relaciona con la disfuncionalidad del sistema de señalización, tal y como indican las alteraciones en los niveles de ERK1 y AKT. La respuesta transcripcional de dicha ruta de señalización a nivel de factores neurogénicos como *Mki67*, *Dcx*, *Calb1* se ven claramente reducidos por OEA y THC, al igual que el marcador neuronal de apoptosis *Caspasa 3*.

Por último, es importante recalcar que existe una relación directa entre la señalización de BDNF y los fenómenos pro/anti-inflamatorios mediados por citoquinas y quimioquinas que resultan en la activación del sistema inmunológico residente (células microgliales). A priori el alcohol, al inducir neuroinflamación, podría desregular el sistema inmunológico y producir cambios en el cerebro similares a los observados durante el envejecimiento y que alterarían la señalización trófica del BDNF (149). Sin embargo, en estos estudios no hemos analizado en profundidad la conexión neuroinflamatoria, que podría estar contribuyendo al deterioro cognitivo observado en los pacientes de AUD y/o en los modelos animales de exposición al alcohol.

5.8. Relación entre los niveles endógenos de OEA y

BDNF.

Por otro lado, consideramos de interés completar la investigación con datos sobre los niveles endógenos de OEA y BDNF de forma relacionada. En un estudio realizado por nuestro grupo de investigación y pendiente aún de ser publicado, se analizaron los niveles de BDNF y OEA en una población de 88 casos y 85 controles.

Los datos de este estudio concuerdan con todo lo expuesto anteriormente, ya que se pudo observar que la OEA mantenía una correlación positiva con BDNF tanto en pacientes como en controles. Esto refuerza la teoría del papel de la OEA como factor neuroprotector, relacionándose además con la señalización mediada por BDNF que, como ya hemos visto, está fuertemente implicada en los procesos de supervivencia y diferenciación celular en el hipocampo.

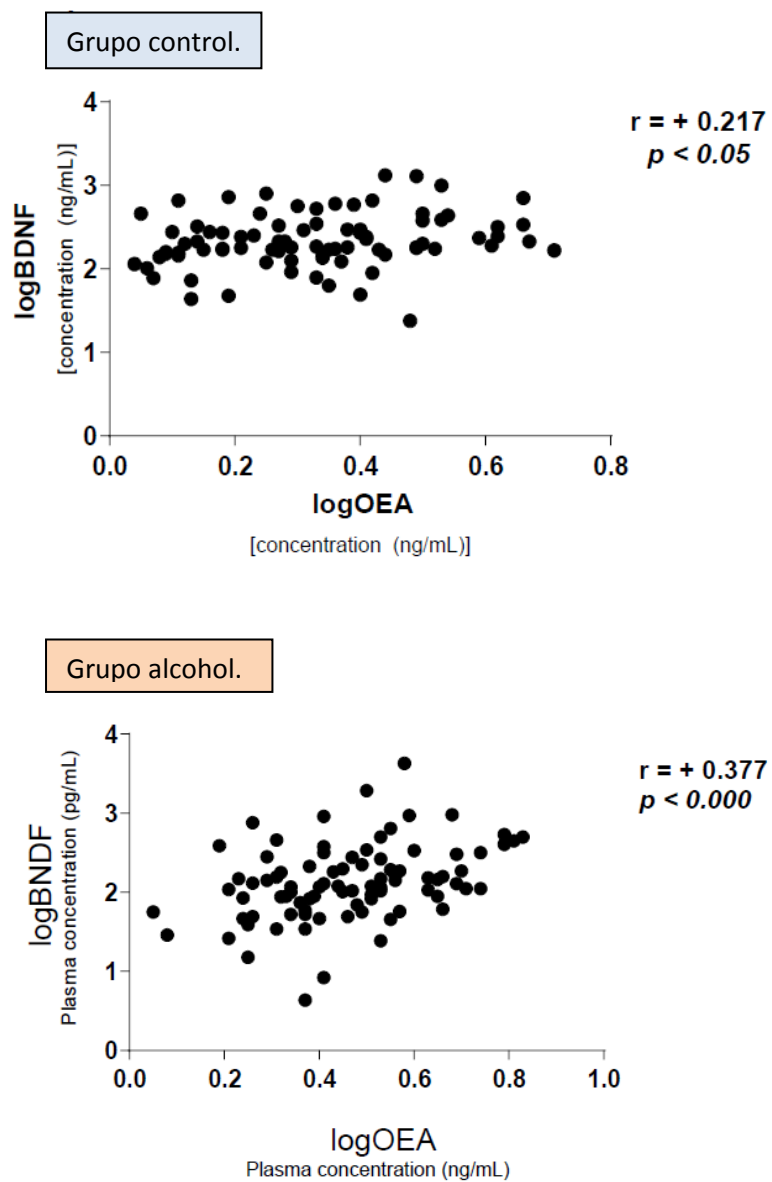
El consumo de THC provoca un aumento de BDNF, como se describe en la figura 2 del tercer artículo de la presente Tesis Doctoral. No obstante, el posible beneficio que derivaría de dicho incremento en los niveles circulantes de BDNF no se ve reflejado en la memoria, ya que el THC afecta a la transmisión glutamatérgica y GABAérgica, deteriorando la memoria reciente (147). La OEA contrarresta este efecto, ya que además de producir un aumento en los niveles circulantes de BDNF, restaura la pérdida de memoria inducida por el consumo de THC.

Teniendo en cuenta todos estos datos, la asociación BDNF-OEA se posiciona como potencial mediadora de la respuesta cerebral ante el efecto nocivo del alcohol, lo que podría desembocar en futuras terapias frente al problema del deterioro cognitivo inducido por consumo.

En la página siguiente pueden verse las gráficas que plasman la correlación significativa entre los niveles endógenos de OEA y BDNF tanto en el grupo control como en el grupo pacientes.

Figura 13

Correlación entre niveles endógenos de BDNF y OEA.



6. Conclusiones y futuras líneas de investigación

6.1. Conclusiones

- I. El consumo continuado de alcohol provoca un marcado deterioro cognitivo. Dado que en la actualidad aún no existe plena conciencia de la relación directa entre consumo de alcohol y deterioro, es importante resaltar este hecho como la primera y más importante de las conclusiones.
- II. El nivel educativo juega un importante papel protector frente al deterioro cognitivo inducido por el consumo de alcohol.
- III. Los pacientes con diagnóstico de trastorno por uso de alcohol asociado a deterioro cognitivo muestran reducciones en las concentraciones circulantes de los factores de crecimiento BDNF, NT-3 y e IGF-2.
- IV. La marcada bajada de BDNF asociada al consumo de alcohol se observa tanto en humanos como en modelos animales, en los que también correlaciona con deterioro cognitivo. Por ello, dicha molécula se posiciona como un potencial biomarcador de consumo.
- V. Además, el consumo de alcohol provoca una hipoactivación de la señalización molecular del sistema BDNF/ERK/AKT en el hipocampo.
- VI. El consumo de alcohol está relacionado con una alteración en los factores neurogénicos en el hipocampo y una peor función cognitiva.
- VII. El sistema endocannabinoide tiene un fuerte papel regulador de la neurogénesis y el sistema de señalización BDNF-ERK en el hipocampo.
- VIII. Existe una relación entre BDNF, sistema endocannabinoide, OEA, THC que modula los procesos neurogénicos en el hipocampo.

- IX. La OEA tiene un papel regulador de los procesos de proliferación y supervivencia neuronal en el hipocampo a través de su interacción con la expresión de factores neurogénicos.

6.2. Futuras líneas de investigación relacionadas con el presente trabajo

- I. Estudiar los efectos de una administración exógena de BDNF tanto a nivel cognitivo como a nivel conductual en un contexto alcohólico.
- II. Realizar un experimento en animales similar al modelo del Estudio 2 en ratones *knock-out* para el gen *bdnf*.
- III. Dentro de los trabajos de nuestro grupo de investigación, profundizar en el estudio del efecto de OEA y THC sobre los animales con consumo de alcohol.
- IV. Estudiar a nivel neurobiológico los mecanismos por los cuales el alto nivel educativo ejerce su papel protector frente al deterioro cognitivo y potenciar y desarrollar terapias eficaces en las que tome un papel protagonista como ayuda, o incluso como alternativa, al tratamiento farmacológico.
- V. Profundizar en los efectos de la asociación entre OEA y BDNF a nivel cerebral como agentes neuroprotectores y moduladores de la actividad neuronal en el hipocampo.

7. Anexos

7.1 Anexo 1

**Adaptación de la Batería de evaluación del lóbulo frontal.
(Frontal Assessment Battery, FAB)**

FAB (Frontal Assessment Battery – Batería de evaluación del lóbulo frontal)

Es un test exploratorio que evalúa las funciones de los lóbulos frontales y del síndrome ejecutivo a través de 6 subtest: semejanzas (formación de conceptos), fluidez verbal (flexibilidad mental), series motoras (programación), interferencia (realización de instrucciones conflictivas), control (inhibición de respuestas) y autonomía (independencia del medio exterior.) Cada subtest se valora de 0 a 3 puntos y, por lo tanto, la puntuación máxima es de 18 puntos. El punto de corte para el déficit frontosubcortical lo localizamos en 16-15, y el punto de corte para la demencia frontosubcortical, en 13-12 (Dubois et al, 2000; Rodríguez del Álamo, 2003)

1. Semejanzas (Conceptualización)

“¿En qué se parecen...?”

- a) Un plátano y una naranja.
- b) Una mesa y una silla.
- c) Un tulipán, una rosa y una margarita.

Ayudar al paciente en caso de fracaso total: “No se parecen”, o parcial; “los dos tienen cáscara” en el primer ítem, no en los siguientes. Sólo las respuestas de categoría (frutas, muebles, flores) se consideran correctas.

Puntaje: 3 correctas=3; 2 correctas= 2; 1 correcta = 1; Ninguna correcta= 0 __/3

2. Fluidez léxica (Flexibilidad mental)

“Diga todas las palabras que pueda (por ejemplo, animales, plantas y objetos, pero no nombres propios ni apellidos) que comiencen con A”. Si no responde en los primeros 5 segundos decirle “por ejemplo, árbol”. Si se detiene por más de 10 segundos, insista: “cualquier palabra que empiece por A”. Tiempo: 60 segundos. Las repeticiones, derivaciones (árbol, arbolito), nombres propios y apellidos no cuentan.

Puntaje: 10 o más palabras= 3; 6 a 9=2; 3 a 5=1; menos de 3=0 __/3

3. Secuencias

“Mire con atención lo que hago”; el examinador frente al paciente realiza 3 veces la prueba de Luria (golpear con nudillo, canto y palma) con su mano izquierda. “Con su mano derecha haga lo mismo que yo, primero juntos, después solo”. El examinador hace la serie 3 veces con el paciente y le dice “ahora haga lo mismo Vd. Solo”.

Puntaje: 6 series consecutivas correctas = 3; 4 a 5 series correctas = 2; no lo hace solo pero sí 3 series consecutivas con el examinador = 1; no logra ni siquiera imitar 3 veces= 0 __/3

4. Instrucciones Conflictivas (Sensibilidad a la interferencia)

“Cuando yo golpee 1 vez, debe golpear 2 veces”, Para asegurar que comprendió las instrucciones se hace una serie de 3 ensayos: 1-1-1. “Cuando yo golpee 2 veces, debe golpear una”; para asegurar que comprendió las instrucciones se hace una serie de 2-2-2. El examinador realiza la siguiente serie: 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.

Puntaje sin errores= 3; 1 o 2 errores =2; más de 2 errores =1; si golpea igual que el examinador al menos 4 veces consecutivas=0 __/3

5. Go no Go (Control inhibitorio)

“Cuando yo golpee 1 vez, debe golpear 1 vez”, Para asegurar que comprendió las instrucciones se hace una serie de 3 ensayos: 1-1-1. “Cuando yo golpee 2 veces, no debe golpear”; para asegurar que comprendió las instrucciones se hace una serie de 2-2-2. El examinador realiza la siguiente serie: 1-1-2-1-2-2-2-1-1-2.

Puntaje sin errores= 3; 1 o 2 errores =2; más de 2 errores =1; si golpea igual que el examinador al menos 4 veces consecutivas=0 __/3

6. Conducta de prehensión (autonomía del ambiente)

El examinador se sienta frente al paciente, que tiene las manos sobre sus rodillas, con las palmas hacia arriba. El examinador acerca lentamente sus manos hasta tocar las del paciente para ver si se las toma espontáneamente. Si lo hace, dice “ahora no me tome las manos” y vuelve a tocárselas.

Puntaje: no le toma las manos = 3; duda o pregunta qué tiene que hacer = 2; las toma sin vacilar = 1; las toma aún después de decirle que no lo haga= 0 __/3

Puntuación total: __/18

Dubois, B., Slachevsky, A., Litvan, I., Pillon, B. (2000). The FAB: a frontal assessment battery at bedside. *Neurology*, 55, 1621-1626

Rodríguez del Álamo, A, Catalán Alonso, M.J., Carrasco Marín, L. (2003). FAB: aplicación preliminar española de la batería neuropsicológica de evaluación de funciones frontales a 11 grupos de pacientes. *Revista de neurología*, 36 (7), 605-608.

7.2 Anexo 2

Adaptación del cuestionario de fallos de memoria en la vida cotidiana. (Memory Failures Everyday, MFE-30)

ESCALA ORIGINAL

Sunderland, A., Harris, J.E. y Gleave, J. (1984). Memory failures in everyday life following severe head injury. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 6, 127-142.

TRABAJO DE VALIDACIÓN EN CASTELLANO

Lozoya-Delgado, P., Ruiz-Sánchez-de-León, J.M. y Pedrero-Pérez, E. (2012). Validación del Cuestionario de Quejas Cognitivas para adultos jóvenes: relación entre las quejas subjetivas de memoria, la sintomatología prefrontal y el estrés percibido. *Revista de Neurología*, 54(3), 137-150.

CRITERIOS DE CORRECCIÓN

Nunca o casi nunca = 0; Pocas veces = 1; A veces sí y a veces no = 2; Muchas veces = 3; Siempre o casi siempre = 4

PUNTUACIONES

- PUNTUACIÓN TOTAL:

El MFE-30 es un cuestionario fundamentalmente unifactorial, por lo que la puntuación resulta del sumatorio de las puntuaciones en cada ítem, desde 1 al 30.

- ÍTEMS MÁS RELACIONADOS CON EL FUNCIONAMIENTO GENERAL:

Ítem 1 + Ítem 3 + Ítem 4 + Ítem 5 + Ítem 10 + Ítem 11 + Ítem 12 + Ítem 13 + Ítem 15 + Ítem 16 + Ítem 17 + Ítem 18 + Ítem 19 + Ítem 20 + Ítem 21 + Ítem 23 + Ítem 24 + Ítem 26 + Ítem 27 + Ítem 28 + Ítem 29 + Ítem 30

- ÍTEMS MÁS CONCRETOS Y LIGADOS A AVD:

Ítem 2 + Ítem 6 + Ítem 7 + Ítem 8 + Ítem 9 + Ítem 14 + Ítem 22 + Ítem 25

Puntuación medias de los varones = 20,54 (desviación típica = 13,37)

Puntuación medias de las mujeres = 22,02 (desviación típica = 14,55).

BAREMOS PARA LA INTERPRETACIÓN CLÍNICA:

- Por debajo de 8 puntos → el sujeto presenta un funcionamiento mnésico óptimo.
- Entre 8 y 35 puntos → funcionamiento normal con fallos de memoria poco significativos, sin influencia en su desempeño cotidiano.
- Entre 36 y 50 puntos → deterioro en su función mnésica con alguna repercusión en su actividad diaria.
- Por encima de 50 puntos → deterioro mnésico moderado o severo con mayor impacto en su funcionamiento cotidiano.

FORMA ALTERNATIVA DE CORRECCIÓN:

Consiste en considerar sólo las dos categorías superiores de frecuencia de los síntomas (“muchas veces” y “siempre o casi siempre”).

- Ningún síntoma con frecuencia elevada → rendimiento mnésico óptimo.
- Entre 1 y 4 síntomas frecuentes → rendimiento mnésico normal.
- Entre 5 y 8 síntomas frecuentes → déficit mnésico de intensidad leve.
- Un total de 9 o más síntomas frecuentes → deterioro mnésico en grado moderado o severo.

MODIFICACIÓN DEL CUESTIONARIO DE FALLOS DE MEMORIA EN LA VIDA COTIDIANA (MFE-30)

**¿TIENE USTED
PROBLEMAS DE MEMORIA?** No Sí

INSTRUCCIONES

A continuación hay una lista de 30 fallos de la memoria que pueden ocurrir en la vida cotidiana. Marque en la opción que mejor le represente. Señale con una X sobre la casilla NUNCA O CASI NUNCA si cree que esa afirmación no es correcta sobre usted; POCAS VECES si es algo que le ha pasado, pero en contadas ocasiones; A VECES SÍ Y A VECES NO, si le sucede o no le sucede con la misma frecuencia; MUCHAS VECES si es algo que le pasa a menudo; y SIEMPRE O CASI SIEMPRE si la afirmación representa algo muy habitual en usted.

POR FAVOR, RESPONDA A TODAS LAS PREGUNTAS.

| | | NUNCA O CASI NUNCA | POCAS VECES | A VECES SÍ Y A VECES NO | MUCHAS VECES | SIEMPRE O CASI SIEMPRE |
|----|--|--------------------------|----------------|-------------------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | Los fallos de mi memoria me causan problemas en la vida cotidiana | | | | | |
| 2 | Olvido dónde he puesto alguna cosa. Pierdo cosas por casa | | | | | |
| 3 | Olvido lugares en los que otros me dicen que he estado antes | | | | | |
| 4 | Tengo dificultades para seguir una historia por televisión | | | | | |
| 5 | No me adapto a los cambios en mis actividades diarias. Sigo por error antiguas rutinas | | | | | |
| 6 | Tengo que volver a comprobar si he hecho alguna cosa que tenía la intención de hacer | | | | | |
| 7 | Olvido cuándo ocurrieron algunas cosas | | | | | |
| 8 | Olvido llevar conmigo objetos que necesito (llaves, gafas, monedero...) o me los dejo y tengo que volver a buscarlos | | | | | |
| 9 | Olvido algo que me dijeron ayer o hace pocos días | | | | | |
| 10 | Empiezo a leer algo sin darme cuenta de que ya lo había leído antes | | | | | |
| 11 | Divago en las conversaciones y me dejo llevar hacia temas sin importancia | | | | | |

| | | NUNCA O CASI NUNCA | POCAS VECES | A VECES SÍ Y A VECES NO | MUCHAS VECES | SIEMPRE O CASI SIEMPRE |
|----|--|-----------------------------------|------------------------|--|-------------------------|---------------------------------------|
| 12 | No reconozco a parientes o amigos cuando me cruzo con ellos por la calle | | | | | |
| 13 | Tengo dificultades para aprender nuevas habilidades o destrezas | | | | | |
| 14 | Tengo una palabra "en la punta de la lengua". Sé lo que quiero decir pero no encuentro la expresión adecuada | | | | | |
| 15 | Olvido cosas que quería hacer o que había planeado hacer. Se me olvidan las citas | | | | | |
| 16 | Olvido detalles de lo que hice o me ocurrió el día anterior | | | | | |
| 17 | Olvido el tema de una conversación o tengo que preguntar: ¿de qué estábamos hablando? | | | | | |
| 18 | Pierdo el hilo cuando leo un periódico, una revista o un libro y tengo que volver a empezar | | | | | |
| 19 | Olvido dar recados importantes a la gente | | | | | |
| 20 | Olvido detalles sobre mi mismo (mi edad, mi teléfono...) | | | | | |
| 21 | Mezclo o confundo detalles de cosas que me han contado otras personas | | | | | |
| 22 | Olvido anécdotas o chistes que me han contado anteriormente | | | | | |
| 23 | Olvido detalles de cosas que hago habitualmente (lo que tengo que hacer o la hora a la que debo hacerlo) | | | | | |
| 24 | Olvido caras de personas famosas que veo con frecuencia por televisión o en fotografías | | | | | |
| 25 | Olvido dónde guardo las cosas o las busco sitios equivocados | | | | | |
| 26 | Me pierdo o sigo una dirección errónea en viajes, paseos o edificios en los que he estado antes | | | | | |
| 27 | Hago algo dos veces por error cuando sólo había que hacerlo una (p.e. echar sal en la comida) | | | | | |
| 28 | Repito a alguien lo que acabo de contarle o le hago dos veces la misma pregunta | | | | | |
| 29 | Olvido cómo se usa un objeto o aparato nuevo aunque ya lo hubiera usado antes | | | | | |
| 30 | Olvido el nombre de personas conocidas | | | | | |

8. Referencias bibliográficas

1. World Health Organization (2015) Global status report on alcohol and health. WHO. 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27212249>
- 2.. Observatorio Español de las Drogas y las Toxicomanías, ESTADÍSTICAS 2013 Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España. 2016, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas.
3. School, EAE Business. El gasto en tabaco, alcohol y juego en España. 2016.
4. Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES). 2015-2016,
5. Pavón FJ, Marco EM, Vázquez M, Sánchez L, Rivera P, Gavito A, et al. Effects of Adolescent Intermittent Alcohol Exposure on the Expression of Endocannabinoid Signaling-Related Proteins in the Spleen of Young Adult Rats. 2016, Plos One, p. 11 (9) e 0163752.
6. Baigorri, A. y R. Fernández, GIESyT, "Botellón, un conflicto postmoderno", Icaria, Barcelona, 2004.
7. National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism. NIAAA council approves definition of binge drinking. 2004, NIAAA Newsletter. and 3:3.
8. Shah H, et al., Research priorities to reduce the global burden of dementia by 2025. 2016 Lancet Neurol ;15(12):1285-1294.
9. Turner C. How much alcohol is in a 'standard drink'? An analysis of 125 studies. Br J Addict. 1990;85(9):1171-5. [PubMed: 2224197].
10. Gupta S, Warner J. Alcohol-related dementia: a 21st-century silent epidemic?. Br J Psychiatry. 2008;193(5):351-3. doi:10.1192/bjp.bp.108.051425. [PubMed: 18978310].
11. Ankur Sachdeva, Mina Chandra, Mona Choudhary, Prabhoo Dayal and Kuljeet Singh Anand. Alcohol-Related Dementia and Neurocognitive Impairment: A Review Study Int J High Risk Behav Addict. 2016 September; 5(3):e27976. doi: 10.5812/ijhrba.27976.
12. Jauhar S, Smith ID. Alcohol-related brain damage: not a silent epidemic.Br J Psychiatry. 2009;194(3):287-8. doi: 10.1192/bjp.194.3.287b. [PubMed: 19252162].
13. Silva-Peña D, García-Marchena N, Alén F, Araos P, Rivera P, Vargas A, García-Fernández MI, Martín-Velasco AI, Villanúa MA, Castilla-Ortega E, Santín L, Pavón FJ, Serrano A, Rubio G, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Alcohol-induced cognitive deficits. are associated with decreased circulating levels of the neurotrophin BDNF in humans and rats. 2018, September, Addiction Biology doi: 10.1111/adb.12668
14. Harvey RJ, Skelton-RobinsonM, RossorMN.The prevalenceandcauses of dementia in people under the age of 65 years. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003;74(9):1206-9. [PubMed: 12933919].

15. Draper B, Karmel R, Gibson D, Peut A, Anderson P. Alcohol-related cognitive impairment in New South Wales hospital patients aged 50 years and over. *Aust N Z J Psychiatry.* 2011;45(11):985–92. doi:10.3109/00048674.2011.610297. [PubMed: 21961480].
16. Padamsey Z., Emptage N. Two sides to long-term potentiation: A view towards reconciliation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.* 2014, Series B, Biological Sciences, pp. 369, 20130154. .
17. García-Marchena N, Silva-Peña D, Martín-Velasco AI, Villanúa MÁ, Araos P, Pedraz M, Maza-Quiroga R, Romero-Sanchiz P, Rubio G, Castilla-Ortega E, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F, Serrano A, Pavón FJ. Decreased Plasma Concentrations of BDNF and IGF-1 in Abstinent Patients with alcohol use disorders. 2017, *Plos One*, p. 6;12(11).
18. Hebb. *The organization of behaviour*, New York: Wiley., D. O. 1949.
19. Lovinger DM, Abrahao KP. Synaptic plasticity mechanisms common to learning and alcohol use disorder. *Learn Mem.* 2018 Aug 16, 30115764, 25(9):425-434. doi: 10.1101/lm.046722.117.
20. Durand D, Carlen PL. 1984. Impairment of long-term potentiation in rat hippocampus following chronic ethanol treatment. *Brain Res* 308: 325–332.
21. Thinschmidt JS, Walker DW, King MA. 2003. Chronic ethanol treatment reduces the magnitude of hippocampal LTD in the adult rat. *Synapse* 48: 189–197.
22. Stephens DN, Ripley TL, Borlikova G, Schubert M, Albrecht D, Hogarth L, Duka T. 2005. Repeated ethanol exposure and withdrawal impairs human fear conditioning and depresses long-term potentiation in rat amygdala and hippocampus. *Biol Psychiatry* 58: 392.
23. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. 1973, *The journal of physiology*.
24. Tongtong Ge, Wei Yang¹, Jie Fan and Bingjin Li. Preclinical evidence of ghrelin as a therapeutic target in epilepsy. 2017, *Oncotarget*, pp. Vol. 8, (No. 35), pp: 59929-59939.
25. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. 2005, *Annual review of neuroscience*, pp. 28:223-50.
26. Song, Guo-li Ming and Hongjun. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant answers and questions. 2011, *Neuron.*, pp. 70(4): 687–702.
27. Louis LK, Gopurappilly R, Surendran H, Dutta S, Pal R. Transcriptional profiling of human neural precursors post alcohol exposure reveals impaired neurogenesis via

dysregulation of ERK signaling and miR-145. 2017, *Journal of neurochemistry*, p. doi: 10.1111/jnc.14155.

28. Maria Moscoso-Castro, Marc López-Cano, Irene Gracia-Rubio, Francisco Ciruela., Cognitive impairments associated with alterations in synaptic proteins induced by the genetic loss of adenosine A2A receptors in mice. 2017, *Neuropharmacology*, p. 10.1016/j.neuropharm.2017.08.027.

29. David Loxton, Juan J. Canales. Long-term cognitive, emotional and neurogenic alterations induced by alcohol and methamphetamine exposure in adolescent rats. 2017, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, pp. 74; 1–8.

30. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Augustine KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buylla A. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018 Mar 15;555(7696):377-381. doi: 10.1038/nature25975. Epub 2018 Mar 7. PubMed PMID: 29513649.,

31. JG, Downing. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. 2001, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, pp. Vol 69 3: 89-95.

32. ASAM Public Policy Statement. Definition of Addiction. 2011. Recuperado de: <http://www.asam.org/for-the-public/definition-of-addiction>.

33. Consuelo Guerri. Bioquímica de las adicciones. Junio 2012 publicación periódica de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular, Rubes Editorial. N° 172 p. 1-7 .

34. Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ: « Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory». *Annu Rev Neurosci* 2006; 29: 565-98. .

35. Russo SC, Dietz DM, Dumitriu D, Malenka RC, Nestler E. «The addictive synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens». *Trends Neurosci* 2010; 33: 267-327. .

36. Renthal W, Nestler EJ. «Histone acetylation in drug addiction» . *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 387-94. .

37. Verbaten MN. Chronic effects of low to moderate alcohol consumption on structural and functional properties of the brain: beneficial or not? *Hum Psychopharmacol* 2009;24:199-205.

38. 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 and 205548, 30(24):8285-95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0976-10.2010.

39. Pascual M, Baliño P, Aragón CM, Guerri C. Cytokines and chemokines as biomarkers of ethanol-induced neuroinflammation and anxiety-related behavior: role of TLR4 and TLR2. *Neuropharmacology*. 2015 Feb and 25446779., 89:352-9.
40. White AM, Signer ML, Kraus CL, Swartzwelder HS. Experiential aspects of alcohol-induced blackouts among college students. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2004;30:205-224.
41. Read JP, Merrill JE, Kahler CW, Strong DR. Predicting functional outcomes among college drinkers: reliability and predictive validity of the Young Adult Alcohol Consequences Questionnaire. *Addict Behav* 2007; 32:2597-2610.
42. Newlin DB, Pretorius MB. Sons of alcoholics report greater hangover symptoms than sons of nonalcoholics: a pilot study. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14:713-716.
43. Robinson JK, Mair RG. MK-801 prevents brain lesions and delayed-nonmatching-to-sample deficits produced by pyriethamine-induced encephalopathy in rats. *Behav Neurosci* 1992;106:623-633.
44. García-Marchena N, Silva-Peña D, Martín- Velasco AI, Villanúa MA, Araos P, Pedraz M, et al. (2017) Decreased plasma concentrations of BDNF and IGF-1 in abstinent patients with alcohol use disorders. *PLoS ONE* 12(11): e0187634.
45. Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:720-730.
46. Leal G, Bramham CR, Duarte CB. BDNF and Hippocampal Synaptic Plasticity. 2017, *Vitamines and hormones*, pp. 104:153-195.
47. Panja, D., & Bramham, C. R. (2014). BDNF mechanisms in late LTP formation: A synthesis and breakdown. *Neuropharmacology*, 76(Pt. C), 664–676. Panja D., Bramham C. R. 2014.
48. Drake, C. T., Milner, T. A., Patterson, S. L. Ultrastructural localization of fulllength length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. 1999. *The Journal of Neuroscience*, 19, 8009–8026.
49. Pereira, D. B., Rebola, N., Rodrigues, R. J., Cunha, R. A., Carvalho, A. P., Duarte, C. B. 2006. Trkb receptors modulation of glutamate release is limited to a subset of nerve terminals in the adult rat hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 83, 832–844.
50. Voleti, Ronald S. Duman and Bhavya. Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. 2012, *Trends in Neurosciences*, pp. 47-56.

51. Matsuda, N., Lu, H., Fukata, Y., Noritake, J., Gao, H., Mukherjee, S., et al. 2009. Differential activity-dependent secretion of brain-derived neurotrophic factor from axon and dendrite. *The Journal of Neuroscience*, 29, 14185–14198.
52. Dwivedi, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. 2009, *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, pp. 5: 433-449.
53. Lee BH, Kim YK. The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment. 2010, *Psychiatry investigation*, pp. 7(4): 231-235.
54. Kuhn M, Popovic A, Pezawas L. Neuroplasticity and memory formation in major depressive disorder: an imaging genetics perspective on serotonin and BDNF. *Restor Neurol Neurosci*. 2014;32(1):25-49. doi: 10.3233/RNN-139005. Review. PubMed PMID: 23603442.
55. McGough NN, He DY, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, Kharazia V, Janak PH, Ron D. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. 2004, *J Neurosci*, pp. 24(46):10542-52. PMID: 15548669.
56. Hohn A., Leibrock J., Bailey K., Barde Y.A. Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*. 1990 and 10.1038/344339a0., 344:339–341.
57. Rosenthal A., Goeddel D.V., Nguyen T., Lewis M., Shih A., Laramée G.R., Nikolics K., Winslow J.W. Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*. 1990 and 10.1016/0896-6273(90)90203-R., 4:767–773.
58. Maisonpierre P.C., Belluscio L., Squinto S., Ip N.Y., Furth M.E., Lindsay R.M., Yancopoulos G.D. Neurotrophin-3: A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*. 1990 and 247:1446–1451. doi:10.1126/science.2321006.
59. Renn JM, Finklestein SP. Growth factor treatment of stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Apr;4(2):121-5. Review. PubMed PMID: 15857297.
60. Sharma HS, Johanson CE. Intracerebroventricularly administered neurotrophins attenuate blood cerebrospinal fluid barrier breakdown and brain pathology following whole-body hyperthermia: an experimental study in the rat using biochemical and morphological approaches. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Dec;1122:112-29.
61. Fattori V, Abe S, Kobayashi K, Costa LG, Tsuji R. Effects of postnatal ethanol exposure on neurotrophic factors and signal transduction pathways in rat brain. *J Appl Toxicol*. 2008 Apr and 17685400., 28(3):370-6.

62. Aldona Kasprzak, Agnieszka Adamek. The insulin-like growth factor (IGF) signaling axis and hepatitis C virus-associated carcinogenesis (Review). 2012, *International Journal of Oncology*, pp. 41: 1919-1931.
63. O'Kusky J, Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. 2012, *Frontiers in Neuroendocrinology.*, pp. 33: 230–251.
64. Torres-Aleman. Toward a comprehensive neurobiology of IGF-I. I., 2010, *Developmental neurobiology*, pp. 70(5): 384-396.
65. Malberg JE, Platt B, Rizzo SJ, Ring RH, Lucki I, Schechter LE, et al. Increasing the levels of insulin-like growth factor-I by an IGF binding protein inhibitor produces anxiolytic and antidepressant-like effects. 2007, *Neuropsychopharmacology*, pp. 32: 2360–2368.
66. Leggio L, Ferrulli A, Malandrino N, Miceli A, Capristo E, Gasbarrini, G, Addolorato G. Insulin But Not Insulin Growth Factor-1 Correlates With Craving in Currently Drinking Alcohol-Dependent Patients. 2008, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, pp. 32(3): 450-458.
67. AS., Reece. Elevated IGF1 in clinical opiate dependence. 2013, *Neuro Endocrinol Lett.*, pp. 34: 18–26. PMID: 23524620.
68. WM., Partridge. Neurotrophins, neuroprotection and the blood-brain barrier. 2002, *Curr Opin Investig Drugs*, pp. 3(12):1753-7. Review. PMID: 12528312.
69. Z. KostECKA, J. Blahovec. Insulin-like growth factor-binding proteins and their functions (minireview). 1999, *Endocrine Regulation*, pp. 33: 90-94.
70. Llias I, Paparrigopoulos T, Tzavellas E, Karaiskos D, Kontoleon P, Liappas I. IGF-I and IGFBP-3 before and after inpatient alcohol detoxification in alcohol-dependent subjects. 2011, *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, pp. 17(10): CR547-51. PMID: 21959607.
71. RC., Baxter. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): novel ligands mediate unexpected functions. 2013, *J Cell Commun Signal*, pp. 7: 179–189.
72. Yeap BB, Chubb SA, McCaul KA, Ho KK, Hankey GJ, Norman PE et al. Associations of IGF1 and IGFBPs 1 and 3 with all-cause and cardiovascular mortality in older men: the Health In Men Study. 2011, *Eur J Endocrinol*, pp. 164: 715–723.
73. Watanabe K, Uemura K, Asada M, Maesako M, Akiyama H, Shimohama S et al. The participation of insulin-like growth factor-binding protein 3 released by astrocytes in the pathology of Alzheimer's disease. 2015, *Mol brain.*, p. 8: 82.
74. OP Almeida, GJ Hankey, BB Yeap, SA Paul Chubb, J Gollege, L Flicker. Risk of prevalent and incident dementia associated with insulin-like growth factor and insulin-like growth factor-binding protein 3 2017, *Molecular Psychiatry*, pp. 00, 1–5.

75. 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. PubMed PMID: 27212249.,
76. Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC, García-Bueno B, Rodríguez de Fonseca F, Orio L. Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol.* 2017 May;22(3):724-741. doi: 10.1111/adb.12365. Epub 2016 Feb 9. PubMed PMID: 26857094.,
77. Khatri D, Laroche G, Grant ML, Jones VM, Vetreno RP, Crews FT, Mukhopadhyay S. Acute Ethanol Inhibition of Adult Hippocampal Neurogenesis Involves CB1 Cannabinoid Receptor Signaling. *Alcohol Clin Exp Res.* 2018 Apr and 10.1111/acer.13608., 42(4):718-726. doi:.
78. Lu, H.-C., & Mackie, K. (2016). An introduction to the endogenous cannabinoid system. *Biological Psychiatry*, 79(7), 516–525. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.028>.
79. Luk T, Jin W, Zvonok A, Lu D, Lin XZ, Chavkin C, et al. Identification of a potent and highly efficacious, yet slowly desensitizing CB1 cannabinoid receptor agonist. *Br J Pharmacol.* 2004 and 142:495–500.
80. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002 and 54:161–202.
81. Mackie K, Devane WA, Hille B. Anandamide, an endogenous cannabinoid, inhibits calcium currents as a partial agonist in N18 neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol.* 1993 and 44:498–503.
82. Mackie K. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. 2005 *Handb Exp Pharmacol.* 299–325.
83. Iversen L. Cannabis and the brain. 2003, *Brain* 126:1252-1270.
84. Rivera P, Arrabal S, Cifuentes M, Grondona JM, Pérez-Martín M, Rubio L, Vargas A, Serrano A, Pavón FJ, Suárez J, Rodríguez de Fonseca F. Localization of the cannabinoid CB1 receptor and the 2-AG synthesizing (DAGL α) and degrading (MAGL, FAAH) enzymes. in cells expressing the Ca(2+)-binding proteins calbindin, calretinin, and parvalbumin in the adult rat hippocampus. *Front Neuroanat.* 2014 Jun 27;8:56. doi: 10.3389/fnana.2014.00056.,

85. Bilkei-Gorzo A, Albayram O, Draffehn A, Michel K, Piyanova A, Oppenheimer H, Dvir-Ginzberg M, Rácz I, Ulas T, Imbeault S, Bab I, Schultze JL, Zimmer A. A chronic low dose of $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol (THC) restores cognitive function in old mice. *Nat Med.* 2017 Jun;23(6):782-787. doi: 10.1038/nm.4311. Epub 2017 May 8. PubMed PMID: 28481360. ,
86. Nguyen CH, Krewenka C, Radad K, Kranner B, Huber A, Duvigneau JC, Miller I, Moldzio R. THC ($\Delta 9$ -Tetrahydrocannabinol) Exerts Neuroprotective Effect in Glutamate-affected Murine Primary Mesencephalic Cultures Through Restoring Mitochondrial Membrane. Potential and Anti-apoptosis Involving CB Receptor-dependent Mechanism. *Phytother Res.* 2016 Dec;30(12):2044-2052. doi: 10.1002/ptr.5712. Epub 2016 Sep 22. PubMed PMID: 27654887.,
87. Ford TC, Hayley AC, Downey LA, Parrott AC. Cannabis: An Overview of its Adverse Acute and Chronic Effects and its Implications. *Curr Drug Abuse Rev.* 2017 and 28707583, 10(1):6-18. doi: 10.2174/1874473710666170712113042. PubMed PMID:.
88. Mizrahi R, Watts JJ, Tseng KY. Mechanisms contributing to cognitive deficits in cannabis users. *Neuropharmacology.* 2017 Sep 15, 28414051, 124:84-88. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.04.018. Epub 2017 Apr 14. Review. PubMed PMID: and PMC5540, PubMed Central PMCID:.
89. Calabrese EJ, Rubio-Casillas A. Biphasic effects of THC in memory and cognition. *Eur J Clin Invest.* 2018 May and 29574698., 48(5):e12920. doi: 10.1111/eci.12920. Epub 2018 Apr 2. Review. PubMed PMID:.
90. Rodríguez de Fonseca F, Navarro M, Gómez R, Escuredo L, Nava F, Fu J, Murillo-Rodríguez E, Giuffrida A, LoVerme J, Gaetani S, Kathuria S, Gall C, Piomelli D. An anorexic lipid mediator regulated by feeding. *Nature.* 2001 Nov 8 and PMID, 414(6860):209-12. PubMed.
91. Fu J, Gaetani S, Oveisi F, Lo Verme J, Serrano A, Rodríguez De Fonseca F, Rosengarth A, Luecke H, Di Giacomo B, Tarzia G, Piomelli D. Oleyethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR-alpha. *Nature.* 2003 S.
92. Kossatz E, Silva-Peña D, Suárez J, de Fonseca FR, Maldonado R, Robledo P. Octadecylpropyl Sulfamide Reduces Neurodegeneration and Restores the Memory Deficits Induced by Hypoxia-Ischemia in Mice. *Front Pharmacol.* 2018 Apr 19 and 10.3389/fphar.2018, 9:376. doi:. Apr 19;9:376. doi: 10.3389/fphar.2018.00376. eCollection 2018. PubMed PMID: 29725299; PubMed Central PMCID: PMC5917089.,
93. Lin C, Chen PY, Chan HC, Huang YP, Chang NW. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha accelerates neuronal differentiation and this might involve the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Dev Neurosci.* 2018 Aug 26 and 10.1016/, 71:46-51. doi:.

94. Brown JD, McAnally D, Ayala JE, Burmeister MA, Morfa C, Smith L, Ayala JE. Oleoylethanolamide modulates glucagon-like peptide-1 receptor agonist signaling and enhances Exendin-4-mediated weight loss in obese mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2. 2018 Jun 27. doi: 10.1152/ajpregu.00459.2017. PubMed PMID: 29949410.,
95. Gaetani S, Kaye WH, Cuomo V, Piomelli D (September 2008). "Role of endocannabinoids and their analogues in obesity and eating disorders". *Eat Weight Disord.* 13 (3): e42–8. PMID 19011363.
96. Tellez LA, Medina S, Han W, Ferreira JG, Licona-Limón P, Ren X, Lam TT, Schwartz GJ, de Araujo IE. A gut lipid messenger links excess dietary fat to dopamine deficiency. *Science.* 2013 Aug 16 and 2395, 341(6147):800-2. doi: 10.1126/science.1239275. PubMed PMID:.
97. Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, Pavón FJ, Leza JC, García-Bueno B, Rodríguez de Fonseca F, Orió L. Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF- κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive-like behavior induced by ethanol binge administration. *Addict Biol.* 2017 May;22 (3):724-741. doi: 10.1111/adb.12365.,
98. Bilbao A, Serrano A, Cippitelli A, Pavón FJ, Giuffrida A, Suárez J, García-Marchena N, Baixeras E, Gómez de Heras R, Orió L, Alén F, Ciccocioppo R, Cravatt BF, Parsons LH, Piomelli D, Rodríguez de Fonseca F. Role of the satiety factor. oleoylethanolamide in alcoholism. *Addict Biol.* 2016 Jul;21(4):859-72. doi: 10.1111/adb.12276.,
99. Garcia-Marchena N, Pavon FJ, Pastor A, Araos P, Pedraz M, Romero-Sanchiz P, Calado M, Suarez J, Castilla-Ortega E, Orió 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.,
100. Gonzalez-Aparicio R, Blanco E, Serrano A, Pavon FJ, Parsons LH, Maldonado R, Robledo P, Fernandez-Espejo E, de Fonseca FR. The systemic administration of oleoylethanolamide exerts neuroprotection of the nigrostriatal system in experimental Parkinsonism. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2014 Mar;17(3):455-68. doi: 10.1017/S1461145713001259.,
101. Zhou Y, Yang L, Ma A, Zhang X, Li W, Yang W, Chen C, Jin X. Orally administered oleoylethanolamide protects mice from focal cerebral ischemic injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor α . *Neuropharmacology.* 2012 Aug and 63(2):242-9.

102. Hasin, D. S., Trautman, K. D., Miele, G. M., Samet, S., Smith, M., & Endicott, J. (1996) Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders (PRISM): reliability for substance abusers. *Am J Psychiatry*, 153(9), 1195–1201.
103. Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Perez--Dominguez, G., & Martin--Santos, R. Diagnosing comorbid psychiatric disorders in substance abusers: validity of the Spanish versions of the Psychiatric Research Interview of Substance and Mental Disorders and Structured Clinical Interview for DSM IV. , 2004: *Am J Psychiatry Vols.* 161(7), 1231-1237.
104. Morguello, S., Holzer, C. E., Ryan, E., Young, C., Naseer, M., Castellon, S. A., Frol, A. B., Atkinson, J. H., Gelman, B. B., Grant, I. & Singer, E. J. Interrater reliability of the Psychiatric Research Interview for Substance and mental Disorders in an HIV-infected cohort: experience of the National NeuroAIDS tissue Consortium *Int J Methods Psychiaric Res.* 2006, Vols. 15 (3), 131-138.
105. Rodriguez del Alamo A, Catalán Alonso MJ, Carrasco Marín L. (2003) [FAB: a preliminar Spanish application of the frontal assessment battery to 11 groups of patients]. *Rev Neurol.* 36:605-8.
106. Lozoya-Delgado P, Ruiz-Sánchez de León JM, Pedrero-Pérez EJ. Validación de un cuestionario de quejas cognitivas para adultos jóvenes: relación entre las quejas subjetivas de memoria, la sintomatología prefrontal y el estrés percibido. (2012). *Vols. Rev. Neurol* 54: 137-150.
107. Nookala AR, Schwartz DC, Chaudhari NS, Glazyrin A, Stephens EB, Berman NEJ, Kumar. Methamphetamine augment HIV-1 Tat mediated memory deficits by altering the expression of synaptic proteins and neurotrophic factors. *Brain Behav Immun.* 2018 May 2. doi: 10.
108. Decara J, Rivera P, Arrabal S, Vargas A, Serrano A, Pavón FJ, Dieguez C, Nogueiras R, Rodríguez de Fonseca F, Suárez J. Cooperative role of the glucagon-like peptide-1 receptor and β 3-adrenergic-mediated signalling on fat mass reduction through down regulation of KA/AKT/AMPK signalling in the adipose tissue and muscle rats. (2017): *Acta Physiol (Oxf).* Nov 28 doi: 10.1111/apha.13008.
109. Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.
110. Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, et al. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry.* 2010 and 2010/03/26, 11(6):763±73. Epub.
111. Suliman S, Hemmings SM, Seedat S. Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis.

Front Integr Neurosci. 2013 and PM, 7:55. Epub 2013/08/03. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00055>.

112. Wang Y, Huang M, Jiao JT, Wu YL, Ouyang TH, Huang J, et al. Relationship between concentrations of IGF-1 and IGFBP-3 and preoperative depression risk, and effect of psychological intervention on outcomes of high-grade glioma patients with preoperative.

113. Stouthart PJ, Deijen JB, Roffel M, Delemarre-van de Waal HA. Quality of life of growth hormone (GH) deficient young adults during discontinuation and restart of GH therapy. *Psychoneuroendocrinology* 2003 and S0306453002000, 28(5):612±26. Epub 2003/05/03.

114. Lin F, Suhr J, Diebold S, Heffner KL. Associations between depressive symptoms and memory deficits vary as a function of insulin-like growth factor (IGF-1) levels in healthy older adults. *Psychoneuroendocrinology*. 2014 and 2014/03/19., 42:118±23. Epub.

115. Heberlein A, Muschler M, Wilhelm J, Frieling H, Lenz B, Gröschl M, Kornhuber J, Bleich S, Hillemacher T. BDNF and GDNF serum levels in alcohol-dependent patients during withdrawal. (2010) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34:1060-4.

116. Darq E, Warnault V, Phamluong K, Besserer GM, Liu F, Ron D. MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. (2015) *Mol Psychiatry*. 20:1219-31. doi: 10.1038/mp.2014.120.

117. Köhler S, Klimke S, Hellweg R, Lang UE. Serum brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor concentrations change after alcohol withdrawal: preliminary data of a case-control comparison. (2013) *Eur Addict Res*. 19:98-104. doi: 10.1159/00034.

118. Reynolds PM, Mueller SW, MacLaren R. A comparison of dexmedetomidine and placebo on the plasma concentrations of NGF, BDNF, GDNF, and epinephrine during severe alcohol withdrawal. (2015) *Alcohol*. 49:15-9. doi: 0.1016/j.alcohol.2014.11.006.

119. Huang MC, Chen CH, Chen CH, Liu SC, Ho CJ, Shen WW, Leu SJ. Alterations of serum brain-derived neurotrophic factor levels in early alcohol withdrawal. (2008) *Alcohol*. 43:241-5. doi: 10.1093/alcalc/agm172.

120. Joe KH, Kim YK, Kim TS, Roh SW, Choi SW, Kim YB, Lee HJ, Kim DJ. Decreased plasma brain-derived neurotrophic factor levels in patients with alcohol dependence. (2007) *Alcohol Clin Exp Res*. 31:1833-8.

121. Murínová J, Hlaváčová N, Chmelová M, Riečanský I. The evidence for altered BDNF expression in the brain of rats reared or housed in social isolation: A systematic review. (2017) *Front Behav Neurosci*. 11:101. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00101.

122. Bolanos CA, Nestler EJ. Neurotrophic mechanisms in drug addiction. *Neuromolecular Med.* 2004 and PMID:15001814., 5 (1):69±83. Epub 2004/03/06. doi: NMM:5:1:069.
123. Liu X, Zhang T, He S, Hong B, Chen Z, Peng D, et al. Elevated serum levels of FGF-2, NGF and IGF-1 in patients with manic episode of bipolar disorder. *Psychiatry Res.* 2014 and 24793757., 218(1±2):54±60. Epub 2014/ 05/06. doi: S0165-1781(14)00269-8 PMID:.
124. Janak PH, Wolf FW, Heberlein U, Pandey SC, Logrip ML, Ron D. BIG news in alcohol addiction: new findings on growth factor pathways BDNF, insulin, and GDNF. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 and 16441270., 30(2):214± 21. Epub 2006/01/31. PMID:.
125. Rojdmarm S, Brismar K. Decreased IGF-I bioavailability after ethanol abuse in alcoholics: partial restitution after short-term abstinence. *J Endocrinol Invest.* 2001 and 11508780., 24(7):476±82. Epub 2001/08/18 PMID:.
126. Ziegenhorn AA, Schulte-Herbruggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, et al. Serum neurotrophins: a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging.* 2007 and S01, 28(9):1436±45. Epub 2006/08/02.
127. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol.* 2013, 23591370, 9(6):366±76. Epub 2013/04/18. PMID: and PMC4074016.,
128. Muller AP, Fernandez AM, Haas C, Zimmer E, Portela LV, Torres-Aleman I. Reduced brain insulin-like growth factor I function during aging. *Mol Cell Neurosci.* 2012 and 21807098., 49(1):9±12. Epub 2011/08/03. doi: S1044-7431(11)00161-8
129. Aleman A, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I and cognitive function: neuromodulation throughout the lifespan. 2009 *Prog Neurobiol.* 19665513., 89(3):256±65. Epub 2009/08/12.
130. Bernardin F, Maheut-Bosser A, Paille F. Cognitive impairments in alcohol-dependent subjects. *Front Psychiatry.* 2014 and 25076914, 5:78. Epub 2014/08/01. 00078
131. Szabò G, Hoffman PL. Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 maintain functional tolerance to ethanol. 1995 *Eur J Pharmacol.* Dec 4 and 8666023., 287(1):35-41.
132. Popa-Wagner A, Furczyk K, Richter J, Irmisch G, Thome J. Neurotrophin levels at admission did not change significantly upon alcohol deprivation and were positively correlated with the BMI and LDL levels. 2013 *J Mol Psychiatry.* Dec 2 and 10.1186/, 1(1):20. doi:.

133. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From Acquisition to Consolidation: On the Role of Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in Hippocampal-Dependent Learning. (2002) *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, NY). 9:224-237. doi:10.1101.
134. Heldt S, Stanek L, Chhatwal J, Ressler K. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular psychiatry*. (2007) 12:656-670. doi:10.1038/sj.mp.4001957.
135. Cirulli F, Berry A, Chiarotti F, Alleva E. Intrahippocampal administration of BDNF in adult rats affects short-term behavioral plasticity in the Morris water maze and performance in the elevated plus-maze. *Hippocampus*. (2004)14:802-7.
136. Costa MA, Girard M, Dalmay F, Malauzat D. Brain-derived neurotrophic factor serum levels in alcohol-dependent subjects 6 months after alcohol withdrawal. (2011) *Alcohol Clin Exp Res*. 35:1966-73. doi: 10.1111/j.1530-0277.2011.01548.x.
137. Li X, Wolf ME. Multiple faces of BDNF in cocaine addiction. (2015) *Behavioural brain research*. 0:240-254. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.018.
138. Autry AE, Monteggia LM. Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. (2012) *Pharmacol Rev*. 64:238-58. doi: 10.1124/pr.111.005108.
139. Kerman IA. New insights into BDNF signaling: relevance to major depression and antidepressant action. (2012) *Am J Psychiatry*. 169:1137-40. doi: 10.1176/appi.ajp.2012.12081053.,
140. Buckley PF, Pillai A, Evans D, Stirewalt E, Mahadik S Brain derived neurotropic factor in first-episode psychosis. . (2007) *Schizophr Res*. 91:1-5.
141. Andero R, Choi DC, Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. (2014) *Prog Mol Biol Transl Sci*. 122:169-92. doi: 10.1016/B978-0-12-420170-5.00006-4.
142. Jeanblanc J, Logrip ML, Janak PH, Ron D. BDNF-mediated regulation of ethanol consumption requires the activation of the MAP kinase pathway and protein synthesis. (2013) *The European journal of neuroscience*. 37:607-612. doi:10.1111/ejn.12067.
143. Knoth R, Singec I, Ditter M, Pantazis G, Capetian P, Meyer RP, Horvat V, Volk B, Kempermann G. Murine features of neurogenesis in the human hippocampus across the lifespan from 0 to 100 years.(2010) *PLoS One*: e8809.doi:0.1371/journal.pone.000880.
144. Yang LC, Guo H, Zhou H, Suo DQ, Li WJ, Zhou Y, Zhao Y, Yang WS, Jin X. Chronic oleylethanolamide treatment improves spatial cognitive deficits through enhancing hippocampal neurogenesis after transient focal cerebral ischemia. *Biochem Pharmacol*. 2015 Apr.

145. Suliman NA, Taib CNM, Moklas MAM, Basir R. Delta-9-tetrahydrocannabinol ($\Delta(9)$ -THC) induce neurogenesis and improve cognitive performances of male Sprague Dawley rats. *Neurotox Res.* 2018 Feb and 10.1007/s12640-017-9806-x., 33(2):402-411. doi:.
146. D'Souza DC, Pittman B, Perry E, Simen A. Preliminary evidence of cannabinoid effects on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in humans. *Psychopharmacology (Berl).* 2009 Mar and 10.1007/s00213-008-1333-2., 202(4):569-78. doi:.
147. Fan N, Yang H, Zhang J, Chen C. Reduced expression of glutamate receptors and phosphorylation of CREB are responsible for in vivo Delta9-THC exposure-impaired hippocampal synaptic plasticity. *J Neurochem.* 2010 Feb;112(3):691-702. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06489.x. Epub 2009 Nov 11. PubMed PMID: 19912468; PubMed Central PMCID: PMC2809144.
148. Sabia S, Fayosse A, Dumurgier J, Dugravot A, Akbaraly T, Britton A, Kivimäki M, Singh-Manoux A. Alcohol consumption and risk of dementia: 23 year follow-up of Whitehall II cohort study. *BMJ.* 2018 Aug 1;362:k2927.
149. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1 β , BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology.* 2015 Sep;96(Pt A):11-8.