



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

Estudio autorradiográfico de las alteraciones de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato en el sistema nervioso central en consumidores crónicos de alcohol

Eulalia Balbina Villegas Bruguera



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 3.0. Spain License.**

**ESTUDIO AUTORRADIOGRÁFICO DE
LAS ALTERACIONES DE LOS
RECEPTORES N-METIL-D-ASPARTATO
(NMDA) DEL GLUTAMATO EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN
CONSUMIDORES CRÓNICOS DE
ALCOHOL**

TESIS DOCTORAL

Eulalia Balbina Villegas Bruguera

Dirigida por

Dr Ramón Estruch Riba

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BARCELONA**

***ESTUDIO AUTORRADIOGRÁFICO DE LAS
ALTERACIONES DE LOS RECEPTORES N-METIL-D-
ASPARTATO (NMDA) DEL GLUTAMATO EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN CONSUMIDORES
CRÓNICOS DE ALCOHOL***

Tesis presentada por la doctoranda

EULALIA BALBINA VILLEGAS BRUGUERA

para la obtención del grado de Doctora en Medicina

Con el visto bueno del director de la Tesis Doctoral,

DR. RAMÓN ESTRUCH RIBA, Consultor Senior de Medicina
Interna del Hospital Clínic de Barcelona y Profesor Asociado de la
Facultat de Medicina de la Universidad de Barcelona

Barcelona, a 29 de Septiembre de 2014

AGRADECIMIENTOS

Finalmente ha llegado el momento de defender mi tesis doctoral. Un proyecto que he llevado en mi mochila durante veinte años, siempre presente en un rincón de mi conciencia, incluso durante los largos periodos en los que eran otras mis batallas cotidianas. Finalmente mi vida me ha dado un respiro, he podido dejar descansar mis armas de guerrera y centrarme el tiempo necesario en los apasionantes receptores glutamatérgicos y su relación con el consumo de alcohol. Lo sé, ya era hora.

No podría estar aquí escribiendo estas líneas sin el apoyo de muchas personas, cada uno a su manera. Quiero agradecer a todos los miembros de Medicina Interna de l'Hospital Clínic que fueron mis compañeros y guías durante todos los años de residencia. Al Dr Francesc Cardellach, mi primer maestro en la auténtica Medicina. Al Dr Ramón Estruch, por su apoyo constante, sus prácticos consejos y accesibilidad durante todos estos años. A todo el equipo de Alcohol de aquella época, y a todos los residentes que compartieron conmigo tantas guardias, angustias y alegrías. Soy hija del Clínic y lo digo con orgullo.

A todas las médicos, enfermeras y técnicos, que a lo largo de mis años de ejercicio médico me han enseñado a ser profesional y persona.

Gracias a todos.

Dedico esta Tesis a mis padres, que con su esfuerzo y su amor me dieron la oportunidad de escoger mi camino en la vida. Soy lo que soy gracias a ellos.
Gràcies, papa i mama, us estimo.

A mis hijas, Laura, Irene y Andrea, por ser como son, darme su amor y permitirme explotar de puro orgullo materno cuando pienso en ellas.

A mi hermano Joan, por su continuo apoyo y cariño, que ha sobrevivido a absurdas distancias. A mi primo Anton, por su amistad, confianza y sentido del humor. Son dos hombres auténticos, y soy feliz por compartir mi vida con ellos.

Y a Anna, por todo. La vida es un regalo maravilloso, y un privilegio disfrutarla contigo.

*No pretenguis saber, doncs no ens està permès,
la fi que a tu i a mi ens reserven els déus.
Millor serà acceptar el que vingui,
ja siguin molts els hiverns que Júpiter et concedeixi,
o sigui aquest el darrer, el que ara fa que el mar Tirrè xoqui contra la nostra platja.
No siguis boja, cata els bons vins i adapta
al breu espai de la teva vida una esperança llarga.
Mentre parlem fuig el temps envejós.
Viu el dia d'avui. Captura'l.
No te'n fiïs de l'incert demà.*

I sempre, sempre, estima la vida, el nostre privilegi.

Horaci, oda 11 (versió absolutament lliure i personal)

ÍNDICE

ÍNDICE.....	5
ABREVIATURAS UTILIZADAS, TABLAS Y FIGURAS	7
ABREVIATURAS.....	7
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS	10
INTRODUCCIÓN	11
TRANSTORNOS NEUROLÓGICOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE ALCOHOL	11
EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO: ASPECTOS MOLECULARES, FARMACOLÓGICOS Y FUNCIONALES.....	20
GLUTAMATO Y ALCOHOL. INTERACCIÓN MOLECULAR Y FARMACOLÓGICA	49
HIPÓTESIS DE TRABAJO	83
CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA ASOCIADOS A LA INGESTA REGULAR DE ALCOHOL.....	83
ALTERACIONES PERMANENTES EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA. LESIONES GLUTAMATÉRGICAS IRREVERSIBLES.....	84
CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA ASOCIADOS A LA MUERTE SÚBITA.....	85
OBJETIVOS DEL ESTUDIO.....	86
OBJETIVOS PRINCIPALES.....	86
OBJETIVOS SECUNDARIOS	86
MATERIAL Y MÉTODOS	87
INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE LA AUTORADIOGRAFÍA DE RECEPTORES.....	87
OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA	91

DISECCIÓN DEL TEJIDO NEUROLÓGICO	95
PREPARACIÓN DE LAS SECCIONES	95
PROTOCOLO DEL ESTUDIO. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO	96
REGIONES CEREBRALES Y PACIENTES INCLUIDOS	99
CUANTIFICACIÓN DE LOS AUTORADIOGRAMAS.....	101
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	102
RESULTADOS.....	103
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CONTROLES.....	104
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CONSUMIDORES DE ALCOHOL	107
EXPERIMENTOS PREVIOS A LA MACROINCUBACIÓN	111
MACROINCUBACIÓN. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DENSIDADES DE RECEPTORES NMDA EN CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO.....	115
DISCUSIÓN.....	127
CONCLUSIONES.....	145
PUBLICACIÓN	147
BIBLIOGRAFIA	151

ABREVIATURAS UTILIZADAS, TABLAS Y FIGURAS

ABREVIATURAS

AAE: Aminoácidos excitatorios

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato

CA1: Área CA1 del hipocampo

Cb: Hemisferio cerebeloso

CCDV: Canales de calcio dependientes de voltaje

Cd: Núcleo caudado

DG: Gyrus dentatus del hipocampo

DLP: Depresión a largo plazo

FrCxe: Córtex frontal externo

FrCxi: Córtex frontal interno

GABA: Ácido gamma-amino-butírico

Hil: Hilus del giro dentado del hipocampo

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: Óxido nítrico

NOS: Oxidonitricosintetasa

PCP: Fenciclidina

PKC: Proteinquinasa dependiente del calcio

PLP: Potenciación a largo plazo

Put: Putamen

RG: Receptores glutamatérgicos

SNC: Sistema nervioso central

Ver: Vermis cerebeloso

Wcb: Sustancia blanca cerebelosa

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Transtornos neurológicos relacionados con el abuso de alcohol. Pag 13
- Tabla 2.** Agentes modificadores de la liberación y captación de los AAE (adaptada de ben Ari et al, 1992). Pag 45
- Tabla 3.** Hipótesis glutamatérgica de la lesiones cerebrales por ingesta de alcohol (adaptado de Tsai et al, 1995). Pag 68
- Tabla 4.** Edad, género, tiempo entre fallecimiento y congelación de muestras de tejido, causa de muerte y principales antecedentes patológicos de los pacientes controles incluidos en el estudio. Pag 107
- Tabla 5.** Dosis habituales de alcohol puro consumidas (g/día) por los pacientes alcohólicos incluidos en el estudio. La tercera columna diferencia los alcohólicos con abstinencia pre-mortem superior a 48 horas. Pag 110
- Tabla 6.** Edad, género, tiempo entre fallecimiento y congelación de muestras de tejido, causa de muerte y principales antecedentes patológicos de los pacientes alcohólicos incluidos en el estudio. Pag 111
- Tablas 7 y 8.** Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en distintas regiones de cerebro humano de control y consumidores de alcohol (5 semanas de exposición). Experimento 2.. Pag 112
- Tabla 9.** Comparación entre la densidad de receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, entre consumidores de alcohol y controles. Experimento 2. Pag 113
- Tablas 10 y 11.** Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en distintas regiones de cerebro humano de control y consumidores de alcohol (5 semanas de exposición). Experimento 3. Pag 114
- Tabla 12.** Comparación entre la densidad de receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, entre consumidores de alcohol y controles. Experimento 3. Pag 115
- Tabla 13.** Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en distintas regiones de cerebro humano de controles. Macroincubación. Pag 117
- Tabla 14.** Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en distintas regiones de cerebro humano de consumidores de alcohol. Macroincubación. Pag 118
- Tabla 15.** Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores y controles en las tres áreas cerebrales indicadas. Macroincubación. Pag 119

Tabla 16. Dosis de etanol diaria y densidad (en fmol por mg de tejido) de los receptores NMDA en distintas regiones de cerebro humano de consumidores de alcohol no abstinentes, cuantificada mediante la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA. Macroincubación. Pag. 120

Tabla 17. Dosis de etanol diaria y densidad (en fmol por mg de tejido) de los receptores NMDA en distintas regiones de cerebro humano de consumidores de alcohol abstinentes, cuantificada mediante la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA. Macroincubación. Pag 121

Tabla 18. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores no abstinentes y bebedores abstinentes las tres áreas cerebrales indicadas. Macroincubación. Pag. 121

Tabla 19. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores no abstinentes y controles en las tres áreas cerebrales indicadas. Macroincubación. Pag. 122

Tabla 20. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores abstinentes y controles en las tres áreas cerebrales indicadas. Macroincubación. Pag 122

Tabla 21. Dosis de alcohol diaria y densidad de receptores NMDA en consumidores de dosis altas de alcohol diarias. Macroincubación. Pag 123

Tabla 22. Dosis de alcohol diaria y densidad de receptores NMDA en consumidores de dosis moderadas de alcohol diarias. Macroincubación. Pag. 124

Tabla 23. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de los receptores NMDA en pacientes consumidores de alcohol a dosis altas y consumidores de dosis moderadas. Macroincubación. Pag. 124

Tabla 24. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de los receptores NMDA en pacientes consumidores de alcohol a dosis altas y controles. Macroincubación. Pag. 125

Tabla 25. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de los receptores NMDA en pacientes consumidores de alcohol a dosis moderadas y controles. Macroincubación. Pag. 125

Tabla 26. Características clínicas de los alcohólicos fallecidos por muerte súbita. Pag. 127

Tabla 27. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de los receptores NMDA en pacientes consumidores de alcohol fallecidos por muerte súbita y pacientes consumidores de alcohol fallecidos por causas diversas diferentes de la muerte súbita. Pag 127

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del canal NMDA. Pag 26

Figura 2. Esquema del receptor NMDA, con los principales sitios de reconocimiento de agonistas y antagonistas. Pag. 35

Figura 3. Sitios de unión en el receptor NMDA en la superficie exterior celular, en el interior de la célula, y en el interior del canal. Pag. 39

Figura 4. Unión de agonistas al receptor como fase previa a la apertura del canal. Pag. 39

Figura 5. Apertura del canal intrareceptor y entrada del calcio por el mismo. Pag. 40

Figura 6. Esquema del experimento autorradiográfico (adaptado de E.Ruberte, 1988). Pag. 89

Figura 7. Imágenes autorradiográficas de la unión total del [3H]MK801 en distintas regiones de cerebro humano. Pag. 105

INTRODUCCIÓN

TRANSTORNOS NEUROLÓGICOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE ALCOHOL

El alcoholismo crónico constituye un grave problema médico, de importantes repercusiones económicas y sociales en todos los países occidentales. El consumo crónico de alcohol se asocia a una gran variedad de procesos inflamatorios y degenerativos que afectan a la práctica totalidad de los tejidos humanos. El espectro de afectación crónica del etanol es muy amplio, e incluye cambios psicológicos y en los diferentes órganos y sistemas.

Entre los sistemas más afectados por el abuso de alcohol destaca el Sistema Nervioso (Charness et al 1989, Urbano-Márquez et al 1987 y 1989, Villalta et al 1989, Adams et al 1989). Las enfermedades relacionadas con el alcohol en el sistema nervioso son causadas por la exposición excesiva al alcohol, con o sin la co-existencia de deficiencias nutricionales o vitamínicas. Los efectos tóxicos y metabólicos del alcohol (etanol) varían según la región del cerebro, la edad/ etapa de desarrollo, la dosis y la duración de las exposiciones los efectos del alcohol, y pueden dar lugar a alteraciones en prácticamente todos los niveles del sistema nervioso (Tabla 1). En el cerebro maduro, la exposición importante y crónica al alcohol puede causar enfermedades debilitantes severas de los sistemas nerviosos central y periférico, y del sistema muscular esquelético. La consecuencia más común del abuso continuado de alcohol abuso es la pérdida desproporcionada de sustancia blanca cerebral y alteraciones en la función ejecutiva cerebral. El cerebelo (especialmente el vermis), los circuitos córtico-límbico, el sistema muscular esquelético y los nervios periféricos se ven también frecuentemente afectados en el alcoholismo crónico. Aunque todos los tipos de células dentro del sistema nervioso son vulnerables a los efectos tóxicos, metabólicos y degenerativos de alcohol, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células terminales sinápticas son los más afectados, ocasionando la atrofia de la sustancia blanca, la neuritis y el deterioro de la sinaptogénesis. Por otra parte, además de la neuropatología degenerativa crónica, los alcohólicos corren el riesgo de padecer graves y potencialmente mortales lesiones hemorrágicas agudas y subagudas en el diencefalo y el tronco cerebral debido a la deficiencia de tiamina, que ejerce efectos tóxicos y metabólicos

en la glía, la mielina y la microvasculatura. El alcohol también tiene efectos neurotóxicos y teratogénicos devastadores sobre el desarrollo del cerebro durante el desarrollo fetal (el llamado síndrome alcohólico fetal).

<u>Grupos sindrómicos</u>	<u>Patologías</u>
Intoxicación alcohólica aguda	
Síndrome de abstinencia alcohólica	Temblor Alucinaciones Convulsiones Delirium tremens
Enfermedades nutricionales asociadas al alcohol	Enfermedad de Wernicke-Korsakoff Ambliopía alcohol-tabaco Pelagra
Enfermedades asociadas a la acción tóxica del alcohol	Demencia alcohólica Degeneración cerebelosa alcohólica Mielinólisis pontina central Enfermedad de Marchiafava-Mignami Polineuropatía alcohólica
Disautonomía alcohólica	
Síndrome alcohólico fetal	

Tabla 1. Transtornos neurológicos relacionados con el abuso de alcohol

Actualmente se cree que los principales mediadores de las lesiones neurológicas provocadas por el alcohol son:

1. Los propios efectos neurotóxicos del etanol, de sus metabolitos oxidativos y no oxidativos (etil ésteres de ácidos grasos), de las alteraciones de los canales neuronales dependientes del calcio, de los efectos sobre los receptores de los aminoácidos excitadores glutamatérgicos y de los inhibidores (GABA) o del acúmulo de radicales libres (McCullen et al 1984, King et al 1988, Arendt et al 1988, Harper et al 1985, Lieber et al 1988, Hemby et al 2006, De la Monte et al 2014).
2. Factores nutricionales. Los alcohólicos crónicos frecuentemente están malnutridos o presentan déficits vitamínicos que complican o agravan las lesiones tóxicas

producidas por el alcohol, en especial la tiamina (Thompson et al 1983, Victor et al 1989, Korsten et al 1979, Vetreno et al 2011).

3. Factores genéticos. Durante los últimos años se ha demostrado una predisposición genética al alcoholismo, especialmente en los hijos de varones adultos con alcoholismo crónico (Cloninger et al 1987, Schuckit et al 1985). Estudios llevados a cabo con individuos adoptados y con gemelos han puesto de manifiesto que alrededor del 40-60% de la variación en la vulnerabilidad al alcoholismo tendría una base genética (Heath et al 1997, Kendler et al 1992, Enoch et al 2001, Goldman et al 2007). Recientemente se han puesto de manifiesto polimorfismos de genes responsables de la síntesis de proteínas receptoras de neurotransmisores, tanto no glutamatérgicos como los GABA (Devaud et al 2004) como los glutamatérgicos, y cuya presencia en la genética del individuo se asocia al alcoholismo, al inicio precoz del hábito alcohólico y/o al mayor padecimiento de complicaciones graves durante la abstinencia de alcohol (Wernicke et al 2003, Kim et al 2006, Preuss et al 2006, Kranzler et al 2009, Ray et al 2009). Algunos estudios sugieren que existen diferentes subtipos de alcoholismo con arquitecturas genéticas distintas (Cloninger et al 1987). Por otra parte, algunas alteraciones genéticas pueden determinar el desarrollo de ciertas complicaciones neurológicas. Así, por ejemplo, las alteraciones determinadas genéticamente en la enzima transketolasa pueden explicar que sólo un subgrupo de pacientes alcohólicos malnutridos pueda padecer el síndrome de Wernicke-Korsakoff (Blass et al 1977). En cuanto al género, también se han detectado diferencias en los niveles de subunidades proteicas de receptores glutamatérgicos entre hombres y mujeres alcohólicos (Devaud et al 2004), que refuerzan los resultados obtenidos previamente en ratas (Devaud et al 1999).

A continuación se describen brevemente algunos de los principales problemas neurológicos en el SNC secundarios al abuso de alcohol.

Intoxicación etílica aguda

Los signos y síntomas de la intoxicación aguda por etanol son bien conocidos y se correlacionan con las concentraciones de alcohol alcanzadas en sangre, que traducen los niveles de etanol en el cerebro (Goldstein et al 1983). La intoxicación alcohólica aguda da lugar a dos síndromes: uno conductual, con excitación, locuacidad, desinhibición y posteriormente estupor y coma, y otro cerebeloso, con ataxia, disartria y alteración de la coordinación.

En personas no alcohólicas, las concentraciones de alcoholemia superiores a 25 mg/dl ya pueden producir una inhibición de las vías neuronales polisinápticas de la formación reticular, córtex y cerebelo. A medida que aumenta el nivel de alcoholemia dicha inhibición provoca una hiperexcitabilidad del córtex manifestada por euforia, locuacidad, aumento de la sociabilidad, incoordinación y dificultad de concentración y raciocinio. A concentraciones superiores a 100 mg/dl aparecen signos de disfunción vestibular y cerebelar que dan lugar a nistagmo, diplopia, disartria y aumento de la ataxia. La cifra en el límite inferior a partir de la cual la mayoría de los trabajos consideran al individuo no alcohólico bajo los efectos de la intoxicación aguda por alcohol es de 130 mg% (28mM).

Con estos niveles de alcoholemia puede afectarse también el sistema nervioso autónomo, lo que explicaría los cuadros de hipotensión e hipotermia que a veces desarrollan estos individuos. A concentraciones superiores aparece estupor u obnubilación, habla incoherente, vómitos y disnea. Si se alcanzan los 400 mg/dl el paciente entra en coma profundo. La dosis letal 50 de etanol es de 500 mg/dl por parálisis respiratoria, aunque se han conseguido remontar pacientes con intoxicaciones de incluso 1127 mg/dl (Berild et al 1981). Sin embargo, los alcohólicos crónicos desarrollan una tolerancia al etanol, de modo que pueden parecer sobrios a concentraciones de etanol relativamente elevadas. En la Unidad de Alcohología del Hospital Clínico se han observado casos de intoxicaciones agudas de 400 mg/dl apenas sintomáticas.

Relacionadas con las intoxicaciones etílicas agudas se describen las intoxicaciones patológicas y las lagunas o amnesias alcohólicas (*blackout*). La intoxicación patológica se refiere a la rápida aparición de una excitación extrema, con conductas irracionales o violentas tras la ingesta de relativamente pequeñas cantidades de alcohol, en lugar del efecto sedativo habitual. Estos episodios duran minutos u horas, y suelen ser seguidos de un estado de somnolencia, del cual el paciente se despierta sin recordar nada.

Las lagunas alcohólicas se refieren a las amnesias, en ocasiones de horas, que algunos pacientes presentan tras una intoxicación etílica aguda. Parece tratarse de un trastorno agudo de la memoria de fijación, sin alteración de otras funciones cerebrales como la memoria inmediata o la remota. Estos episodios no parecen relacionados con trastornos de la conciencia, epilepsia o traumatismos craneales, y se asemejarían de algún modo a la amnesia global transitoria. A pesar de que suelen considerarse como un signo de dependencia al alcohol, estas lagunas pueden aparecer en cualquier fase del alcoholismo, incluso en consumidores ocasionales.

Síndrome de abstinencia alcohólica

Tras el consumo prolongado y a dosis altas de etanol, los alcohólicos adquieren un estado de dependencia física al etanol que se caracteriza por la aparición de manifestaciones neurológicas cuando el enfermo cesa o reduce drásticamente su ingesta (Sellers et al 1976). Suelen padecerlo aquellos alcohólicos que han consumido una mayor cantidad de alcohol durante un tiempo más prolongado. Las manifestaciones del síndrome de abstinencia alcohólico suelen clasificarse en precoces (temblor, alucinaciones, arritmias y convulsiones) y tardías (delirium tremens).

Síndrome de abstinencia precoz

Suele aparecer a las pocas horas de dejar de beber y persiste generalmente de 3 a 5 días, aunque puede durar dos semanas. El síntoma más común es la aparición de un temblor distal, fundamentalmente matutino tras la abstinencia nocturna, que suele acompañarse de náuseas y vómitos, llamados pituitas matutinas. Aunque es un temblor generalizado, suele ser más evidente en las manos, se acentúa con la actividad motora o el estrés emocional y cede con la reingesta alcohólica. Si el paciente no vuelve a ingerir alcohol, el temblor se intensifica y aparecen insomnio, agitación, enrojecimiento facial, inyección conjuntival, sudoración, taquipnea e hipertensión arterial. Aproximadamente un 25% de los pacientes abstinentes con temblor refieren además pesadillas, ilusiones y alucinaciones, generalmente visuales, pero también auditivas, táctiles y olfatorias. Las alucinaciones visuales suelen incluir la visión de insectos o zoopsias, que no son específicas de la abstinencia alcohólica, la visión de animales o personas imaginarias..

El etanol es capaz de inducir crisis convulsivas en los pacientes epilépticos. La prevalencia de epilepsia en alcohólicos dependientes es tres veces superior a la de la población general. Por otro lado, entre un 5 y un 15% de los enfermos alcohólicos crónicos presentan en las primeras 48 horas de abstinencia un cuadro convulsivo único o acumulado, y excepcionalmente (2% de los casos) pueden llegar a un estado epiléptico (Ng et al 1988). En el contexto de la población general, el abuso del alcohol es un importante precipitante del estado epiléptico (9-25% de los casos según las series). Suelen tratarse de convulsiones tónico-clónicas generalizadas de tipo gran mal y pueden acompañarse de alucinaciones y temblor. La aparición de convulsiones en el período de abstinencia alcohólica se relaciona actualmente con cambios en el flujo de calcio y cloro a través de los receptores NMDA y GABA (Hillbom et al 2003).

Delirium tremens

Hasta un 30% de estos pacientes desarrollan posteriormente un cuadro de *delirium tremens*, que aparece entre las 48 y las 72 horas de la última ingesta alcohólica. La presencia de fiebre alta, malnutrición y alteraciones hidroelectrolíticas favorecen la aparición de esta complicación (Naranjo et al 1986).

El *delirium tremens* se caracteriza por obnubilación, agitación, insomnio, temblor, y alucinaciones vívidas, junto a signos de hiperactividad del sistema nervioso autónomo (fiebre, taquicardia, midriasis y diaforesis profusa). En la mayoría de ocasiones su curso es benigno, no dura más de 72 horas y acaba súbitamente, tal como empezó. Tras el período de agitación e insomnio, el paciente cae en un sueño profundo y se despierta lúcido, tranquilo y exhausto, sin recordar nada del episodio pasado. No obstante, en el 5-15% de los casos la evolución es tórpida y puede originar la muerte del paciente, a veces sin complicaciones objetivables que la justifiquen. El examen anatomopatológico del cerebro de estos enfermos sólo suele mostrar un edema cerebral, sin otras alteraciones manifiestas. El examen del líquido cefalorraquídeo suele ser normal. Por último, en algunas ocasiones, los pacientes alcohólicos pueden presentar otras manifestaciones clínicas del síndrome de abstinencia alcohólica, como arritmias cardíacas, oftalmoplejía internuclear o estados confusionales, que si se presentan aisladas pueden ser difíciles de reconocer como tales.

Síndrome de Wernicke-Korsakoff

Se trata de un cuadro neurológico habitualmente originado por un déficit de tiamina, que se observa con relativa frecuencia en los pacientes alcohólicos crónicos, aunque también puede observarse en enfermos con malabsorción, anorexia asociada a neoplasias y quimioterapia, obstrucción intestinal alta, intoxicaciones, tirotoxicosis, hemodiálisis e hiperemesis gravídica.

En la descripción clásica, la encefalopatía de Wernicke se definió como un cuadro clínico de aparición aguda caracterizado por alteraciones oculomotoras, ataxia y estado confusional. Su aparición está íntimamente ligada con una malnutrición y una ingesta prolongada de etanol, por lo que la mayoría de pacientes presentan otras manifestaciones de su alcoholismo crónico, tales como signos de abstinencia alcohólica, neuropatía periférica o hepatopatía crónica (Victor M et al 1989).

En el 96% de los casos se observan alteraciones oculares como nistagmo, parálisis del recto externo bilateral y parálisis de la mirada conjugada. Es excepcional la presencia de lesiones del resto de pares craneales, aunque algunos pacientes presentan ptosis palpebral, típicamente bilateral, alteraciones pupilares y hemorragias retinianas. La oftalmoplejía

externa total y la internuclear son poco frecuentes. La ataxia se observa en un 87% de los casos y se debe a una combinación de las lesiones cerebelosas, vestibulares y de neuropatía periférica.

En la mayor parte de los casos se observa una alteración variable del estado de conciencia. Un 15% de estos pacientes sufren además un cuadro de *delirium tremens* que enmascara cualquier otra manifestación clínica. El resto de los pacientes suelen presentar un cuadro confusional global. De no tratarse adecuadamente el paciente puede entrar en un estado de estupor y coma, sobreviniendo la muerte en un plazo de una o dos semanas (Harper et al 1986).

El diagnóstico es clínico, aunque la neuroimagen puede detectar el incremento de la señal en T2 en la región paraventricular del tálamo, en región periacueductal, o atrofia de los cuerpos mamilares. En todo caso la ausencia de anomalías radiológicas no excluye el diagnóstico (Antúnez et al 1998).

Demencia alcohólica

Los pacientes alcohólicos crónicos que consumen dosis altas (siempre superiores a 80 g/día) durante años pueden padecer un deterioro de las funciones superiores por lesión neurológica a nivel encefálico, que afecta tanto a la sustancia gris como a la blanca, y que no dependen del grado de nutrición, sino al parecer directamente de la intensidad lesiva del propio tóxico (Nicolás et al 1997).

Aproximadamente un 10% de los alcohólicos crónicos presentan un cuadro de deterioro mental grave que les impide el mantenimiento de una vida social normal, aunque hasta el 50-70% presentan alteraciones objetivables de su función mental, como la memoria y la capacidad para desarrollar tareas complejas como conducir (Maylor et al 1987, Hindmarch et al 1991). Asimismo, muchos pacientes alcohólicos crónicos llegan a desarrollar un auténtico síndrome frontal o prefrontal, con alteraciones cognoscitivas, pérdida de la iniciativa y espontaneidad, junto a cambios de personalidad con conductas desinhibidas, aumento de la locuacidad, pérdida del tacto en las relaciones sociales y dificultad de adaptación a nuevas situaciones. En un estudio realizado en la Unidad de Alcoholología del Hospital Clínic se demostró que un 75% de los alcohólicos asintomáticos presentan una disfunción frontal demostrada por pruebas neuropsicológicas y determinación del flujo cerebral regional mediante SPECT. Sin embargo, sólo un 25% de estos pacientes presentaban atrofia frontal detectada por análisis morfométrico de la TC cerebral (Nicolás et al 1993).

En los estudios necrópsicos se ha comprobado que el peso de los cerebros de los pacientes alcohólicos crónicos era significativamente inferior al de una población control de edad y talla similar (Torvik et al 1982, Harper et al 1985). Al parecer las lesiones están en relación con la intensidad de la ingesta. En individuos consumidores de dosis moderadas (30 a 80 g/día) al parecer no se detectan diferencias significativas en la anatomía cerebral con respecto a los controles, aunque sí una tendencia a la reducción en el peso cerebral, el aumento de los ventrículos, y en el espacio entre cerebro y cráneo (Harper et al 1988). A nivel microscópico, en consumidores de dosis diarias entre 41 y 80 g/día (de 3 a 6 bebidas) durante más de 20 años, se objetivan números significativamente menores de células de Purkinje en el cerebelo, pero sin atrofia cerebelar macroscópica (Karhunen et al 1994). Estudios neuropatológicos cuantitativos han demostrado una reducción en el número y el tamaño de las neuronas corticales en los pacientes alcohólicos crónicos con respecto a un grupo control de edad similar, especialmente en los lóbulos frontales, y también, aunque en menor proporción, en los lóbulos temporales.

Las lesiones observadas en los alcohólicos crónicos no se limitan al córtex. También se ha detectado una mayor atrofia de la sustancia blanca respecto a la gris (De la Monte et al 1988) y una reducción significativa en el número de espinas dendríticas de las neuronas corticales piramidales (Ferrer et al 1986, Galofré et al 1987).

Degeneración cerebelosa alcohólica

Aproximadamente la mitad de los pacientes alcohólicos crónicos presentan una degeneración del córtex cerebeloso, especialmente de la porción anterosuperior del vermis y, en los casos más avanzados, de las áreas hemisféricas cerebelosas (Victor et al 1959). Se caracteriza clínicamente por una ataxia del tronco y extremidades inferiores que condiciona una marcha inestable con gran aumento de la base de sustentación. La coordinación de las extremidades superiores suele estar respetada. Acompañando a esta ataxia pueden observarse nistagmo, disartria o temblor, aunque tales síntomas son difíciles de diferenciar de los cuadros de intoxicación alcohólica aguda o de los síndromes de abstinencia. Casi siempre los síntomas se presentan de forma crónica, aunque en ocasiones pueden aparecer de forma aguda y transitoria. Se han observado casos de remisión de los mismos si se consigue una abstinencia alcohólica prolongada y una adecuada nutrición de los pacientes.

Desde el punto de vista anatómico, la lesión se localiza en la porción anterosuperior del vermis, en la que se observa una pérdida neuronal y gliosis de la capa molecular, glandular y especialmente, de las células de Purkinje; asimismo, se ha comprobado una reducción significativa de la arborización dendrítica de las células de Purkinje. También

puede observarse una degeneración secundaria de las olivas y de diferentes núcleos cerebelosos, como el globoso y vestibular (Ferrer et al 1984).

La etiología de este proceso no se conoce con exactitud, aunque un estudio realizado en el Hospital Clínic de Barcelona (Nicolas et al 2000) evidenció que tanto la malnutrición como el consumo diario superior a 140 g/día durante un mínimo de 10 años resultaron factores independientemente asociados al desarrollo de atrofia cerebelosa.

EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO: ASPECTOS MOLECULARES, FARMACOLÓGICOS Y FUNCIONALES

El glutamato es un aminoácido dicarboxílico no esencial que desempeña un papel central en los procesos de transaminación y en la síntesis de distintos aminoácidos, como es el caso de la prolina, oxiprolina, ornitina y arginina. Se acumula en proporciones considerables en el cerebro (100-150 mg por 100 gr de tejido fresco). Procede mayoritariamente de la desaminación de la glutamina, por acción de la glutaminasa. Es un componente importante de muchas proteínas, tiene un papel como intermediario en el metabolismo energético, y es precursor del GABA, el principal neurotransmisor inhibitorio. El balance entre ambos aminoácidos controla la excitabilidad del SNC (Hamberger et al 1993).

El glutamato no atraviesa la barrera hematoencefálica, se sintetiza en la mitocondria de la neurona a partir de glucosa y varios precursores. Después de sintetizarse se libera hacia el citoplasma en donde se acumula en vesículas sinápticas por un proceso dependiente de Mg^{++}/ATP^2 . La propagación del impulso nervioso hacia la terminal axónica, promueve la liberación de Glu en la sinapsis a través de un mecanismo dependiente de la concentración intracelular de Ca^{++} , mediante un proceso de exocitosis, para interactuar con sus receptores específicos.

El glutamato forma parte de los llamados aminoácidos excitadores (AAE) (glutamato, aspartato y otros compuestos relacionados), que son los principales neurotransmisores excitadores del SNC de los mamíferos. Están presentes en la gran mayoría de sinapsis, en las que desempeñan un papel fundamental en muchas de sus funciones (Marco-Igual 1995a). De hecho la mayor parte de las vías excitadoras del SNC son de naturaleza glutamatérgica, en particular las fibras de origen cortical que inervan las estructuras subcorticales, así como las fibras córtico-corticales y de los sistemas sensoriales. Tienen especial relevancia en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado, el cerebelo y la médula espinal. Las neuronas y las células gliales comparten los mismos tipos de receptores de glutamato, excepto los NMDA, que están ausentes en la glía. El glutamato es probablemente el principal excitador glial y la forma más prevalente de señalización neurona-glía. De entre los AAE, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC (Orrego et al 1993).

Además de mediar en la neurotransmisión excitatoria, los receptores glutamatérgicos (RG) participan también en los cambios en la transmisión y plasticidad sinápticas, relacionadas con el desarrollo de la memoria y el aprendizaje, y en la formación de canales neurales durante el desarrollo (Dingledine et al 1988, Monaghan et al 1989).

CLASIFICACIÓN DE LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Los receptores de glutamato se clasifican farmacológicamente en 2 subtipos: los asociados a canales iónicos, o ionotrópicos, y los ligados a proteínas G, o metabotrópicos.

De los receptores metabotrópicos existen al menos 8 subtipos, denominados mGluR1-mGluR8. Basándose en la similitud estructural y farmacológica, se pueden emparejar en tres subgrupos, que están formados por los subtipos mGluR2 y mGluR3, mGluR1 y mGluR5, mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8. Se hallan ampliamente distribuidos por todo el cerebro, con localizaciones diferentes según cada subtipo (Nakanishi et al 1992). Son considerablemente más grandes que los otros miembros conocidos de la familia de receptores ligados a las proteínas G, a través de cuya interacción actúan activando sistemas de segundo mensajero. Los mGluR1 y mGluR5 favorecen la formación del Inositol (1, 4, 5)-trifosfato (IP3), que moviliza los depósitos intracelulares de calcio, y de diacilglicerol, que activa a la fosfoquinasa C. Los cuatro restantes inhiben la formación del AMPc. En el hipocampo regulan la excitabilidad neuronal suprimiendo las corrientes de potasio (Bashir et al 1993). Al parecer, existen evidencias que sugieren que la excitabilidad de grupos de neuronas GABAérgicas en el hipocampo es controlada a través de la activación persistente de diferentes receptores glutamatérgicos, en concreto mGluR2, mGluR3 y mGluR8 (Losonczy et al 2003). Estos receptores pueden desempeñar un papel importante en áreas del hipocampo y del cerebelo implicados en la PLP y DLP, y es probable que estén íntimamente relacionados con el desarrollo y maduración sinápticos (Barnes et al 1992, Klausnitzer et al 2004). Pueden funcionar en aspectos más a largo plazo del control celular, operando a través de proteínas G y sistemas de segundo mensajero (Gasic et al 1992).

En cuanto a los receptores ionotrópicos, en éstos la unión del glutamato a su receptor resulta en un cambio conformacional del mismo, que permite el paso de cationes de calcio y sodio a través de un canal iónico específico. Se han subdividido en tres grupos, atendiendo a sus agonistas específicos: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA). Sin embargo, dado que no hay ningún

agonista ni antagonista que diferencie claramente los receptores AMPA y kainato, se tiende genéricamente a referirse a ellos como receptores no-NMDA (Ozawa et al 1998).

Los receptores AMPA y kainato controlan un canal iónico permeable al sodio y potasio, mientras que el receptor NMDA es además permeable al calcio. Acto seguido estos canales iónicos interactúan directamente con proteínas G o con proteinquinasas. Los receptores AMPA y kainato median los relevos rápidos de la información en los circuitos excitadores, con un inicio y final rápido, mientras que el receptor NMDA es activado por un estímulo potente, que provoca una despolarización relativamente sostenida, con un aumento y descenso de varios cientos de milisegundos, que puede llevar a descargas repetidas, y participar así en el mantenimiento de la actividad neuronal.

La sinapsis más común de los AAE contiene receptores NMDA asociados a receptores no NMDA, generalmente AMPA, pudiendo mediar estos últimos la principal respuesta sináptica rápida independiente del voltaje, favoreciendo de paso la activación dependiente del voltaje del receptor NMDA (Seeburg et al 1993). Así, los receptores NMDA pueden al activarse actuar como un sistema de amplificación, y su activación es crucial para la inducción y mantenimiento de alteraciones prolongadas de la eficiencia sináptica, como la potenciación a largo plazo (PLP) y la depresión a largo plazo (DLP) (Barnes et al 1992).

Se han identificado 14 ADN complementarios, 4 para las subunidades AMPA (GluR1, GluR2, GluR3 y GluR4), 5 para las subunidades kainato (GluR5, GluR6, GluR7, KA1 y KA2), y 5 para las subunidades NMDA (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D). Además, 2 ADN complementarios para subunidades delta ($\delta 1$ y $\delta 2$), cuya función es hasta hoy desconocida. Además de la multiplicidad de genes, la diversidad molecular de los receptores ionotrópicos se ha visto claramente incrementada por variantes debidas a ediciones de ARN alternativas.

Los RG ionotrópicos comparten un número de propiedades en común con los demás miembros de la superfamilia de los canales iónicos. Cada subunidad posee 4 regiones transmembrana (TM1-TM4) hidrofóbicas, una extensa región N-terminal extracelular, un extenso bucle entre TM3 y TM4 también extracelular, y un extremo C-terminal intracelular. Además, cada subunidad posee también lugares potenciales para la regulación por fosforilización colocados en el lado interior de la membrana (Barnes et al 1992, Laube et al 1997). La fosforilización por proteinquinasas es un mecanismo mayor en la regulación funcional de los receptores ionotrópicos de glutamato, y puede tener un papel

prominente en ciertas formas de plasticidad sináptica, como la PLP y la DLP (Raymond et al 1993).

La conducción de calcio a través de los receptores glutamatérgicos es un factor importante para la activación de las enzimas intracelulares dependientes de calcio, la inducción de la PLP y la neurotoxicidad.

Pasamos a comentar brevemente algunos aspectos de los receptores ionotrópicos, y en especial de los NMDA.

COMPLEJO RECEPTOR-IONÓFORO NMDA. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL RECEPTOR NMDA

Los receptores glutamatérgicos ionotrópicos son complejos heteroméricos de varias subunidades receptoras proteicas. El receptor NMDA en particular está formado por proteínas agrupadas en hasta tres familias de subunidades: NR1, NR2 y NR3, aunque en los esquemas clásicos del receptor sigue trabajándose con el complejo NR1-NR2 (Figura 1). Las múltiples isoformas del receptor, que se distribuyen distintamente y que poseen diferentes propiedades funcionales, se explican por la diferente transcripción de las subunidades NR1 y NR2. Por tanto, el dímero NR1-NR2 se considera la estructura base de organización funcional en cada receptor, en donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos.

Globalmente, el receptor está formado por un heterotetrámero o pentámero constituido por dos dímeros conformados por las subunidades NR1-NR2. La subunidad NR1 posee un sitio de unión para la glicina (Gli), y la NR2 uno para el glutamato (Glu), por lo que cada receptor posee dos sitios de unión para ambos ligandos (Schüler et al 2008). La subunidad NR1 está codificada por un gen único, sin embargo, el transcrito puede generar al menos ocho isoformas. Para las subunidades tipo NR2 existen cuatro genes diferentes que codifican para las subunidades NR2A, NR2B, NR2C y NR2D. En cada receptor hay un número variable de subunidades NR2A, B, C y/o D (Dodd et al 1992, Michaelis 1998).

Las funciones de las dos diferentes subunidades de receptor son diferenciadas y complementarias. Las NR1, distribuidas extensamente en el cerebro, son las que fundamentalmente dan forma al receptor heteromérico (Nakanishi et al 1992), y están compuestas por 938 aminoácidos. Al parecer, las subunidades NR1 homoméricas pueden producir receptores con canales que aunque son activados por Glu o NMDA, en presencia de Gli, presentan corrientes de muy baja amplitud con respecto a los receptores formados por la combinación de subunidades NR1-NR2. Por su parte, las subunidades NR2 NR2A-

NR2D están compuestas por 1464, 1482, 1250 y 1323 aminoácidos respectivamente, tienen localizaciones más concretas, y no pueden formar por sí solas receptores con canales activos funcionantes, por lo que sólo se les considera moduladores. Sin embargo, la co-expresión de subunidades NR1 con miembros de la segunda familia de subunidades del receptor NMDA (NR2A, B, C, y/o D), da como resultado receptores con características similares a los receptores nativos (Ikeda et al 1992).

Se ha demostrado la existencia de dos variantes de la subunidad NR3 (a y b) codificada por genes distintos (Das et al 1998). La variante NR3a se expresa en todo el SNC y la expresión de la variante NR3b se restringe exclusivamente a las neuronas motoras. La subunidad NR3, al igual que la subunidad NR2 es una subunidad reguladora, cuya presencia disminuye las corrientes iónicas generadas por la activación de los heterómeros NR1/NR2, por lo que tiene un efecto inhibitor sobre la actividad del receptor (Hawkins et al 1999). Estudios posteriores demostraron que la co-expresión de NR1/NR3b forma receptores de glicina excitadores, insensibles al Glu, al NMDA, y al bloqueo por Mg^{++} . Por este motivo se ha propuesto que este tipo de receptores podría intervenir en la activación de las llamadas sinapsis silenciosas de NMDA.

El dímero NR1-NR2 se considera la estructura base de la unidad funcional del receptor, donde se localizan los diversos sitios de unión y de reconocimiento para diferentes ligandos, tanto fisiológicos como farmacológicos. Cada subunidad de receptores ionotrópicos posee una estructura molecular muy semejante, el cual se organiza en cuatro dominios funcionales que representan una unidad funcional:

- Un *dominio extracelular*, con el amino (N) terminal
- El *dominio de unión al agonista* (Dani et al 1995).
- Una *región transmembrana*, formada por cuatro segmentos hidrofóbicos (M1 a M4) en donde el segmento M2 que ingresa parcialmente a la membrana conforma el canal iónico
- Un dominio del carboxilo (C) en la región intracelular

Adicionalmente en el dímero NR1-NR2, y particularmente en la región extracelular de NR2, existen sitios de unión para ligandos exógenos como las poliaminas, sitios redox para protones y zinc (que pueden regular la actividad del receptor NMDA), así como esteroides, etanol, ifenprodil y otras sustancias.

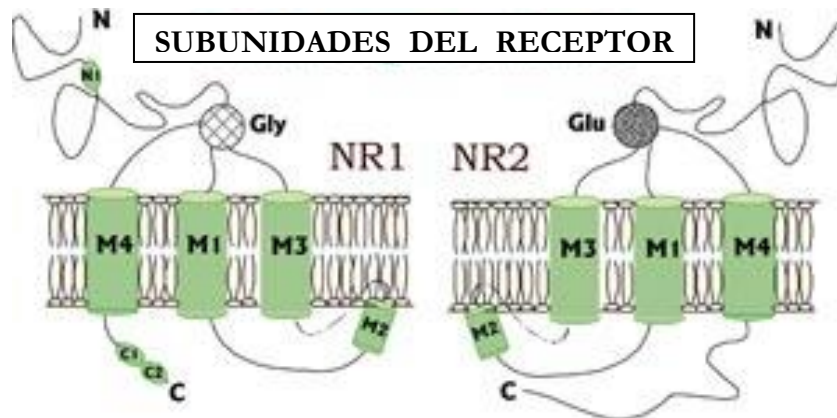


Figura 1. Esquema del canal NMDA, proteína tetramérica formada básicamente por dos tipos de subunidades, llamadas NR1 y NR2. Son necesarias 4 o 5 subunidades para conducir cationes. Cada subunidad posee 4 regiones transmembrana (M1-M4), una extensa región N-terminal extracelular, y un extenso bucle entre M3 y M4, con lugares potenciales para la regulación por fosforilización colocados en el lado interior de la membrana.

Subunidades NR1

Es el producto de un solo gen. El ARNm de la subunidad NR1 comienza a expresarse en el cerebro de rata a partir de los 14 días de desarrollo embrionario, aumentando sus niveles gradualmente hasta tres semanas después del nacimiento. Existen ocho variantes de procesamiento para el ARNm de NR1 (NR1-1a/4a y NR1-1b/4b), generadas por las diferentes combinaciones de tres exones (o partes no fragmentables del ADN del gen que llevan información para la síntesis proteica), los números 5, 21 y 22 (Stephenson et al 2006). El exón 5 codifica la llamada región N1 en el dominio amino-terminal extracelular de la subunidad NR1, una secuencia de 21 aminoácidos, cuya ausencia o presencia en la subunidad delimita dos isoformas, a (-E5) y b (+E5). Este exón es responsable de las diferencias en la sensibilidad de los receptores NMDA a los iones hidrógeno, zinc, y las poliaminas como la espermina (Dingledine et al 1999). En las isoformas que contienen el exón N1, ni las poliaminas ni el Zn^{+} potencian la estimulación por Glu, posiblemente por su naturaleza catiónica y su repulsión por el exón. También se relacionan con la presencia del exón N1 propiedades como la afinidad de los receptores por los agonistas, y su sensibilidad a los antagonistas APV (ácido D(-)-2-amino-5-fosfonopentanoico), CPP, 7-CK y MK-801. La sensibilidad al pH de los NMDA también está determinada por la presencia del exón 5. A pH fisiológico los receptores que incluyen esta variante se activan completamente, mientras que los receptores que carecen del exón 5 están inhibidos de forma parcial (Traynelis et al 1995, Lyuboslavsky et al 2003).

Por su parte los exones 21 y 22 codifican tres secuencias aminoacídicas en la región C-terminal intracelular de la subunidad: C1, C2 y C2'. Tienen un papel importante en la regulación y localización del receptor NMDA en la membrana celular. El exón 21 codifica C1 (37 aminoácidos), susceptible de fosforilación por las fosfoquinasas PKC y PKA (Zukin et al 1995), e involucrado en la regulación positiva de NR1 en respuesta al Glu, y que puede interactuar con la calmodulinquinasa, que modula negativamente la actividad del receptor NMDA (Ehlers et al 1996, Rycroft and al 2004). Además, la región C1 presenta también sitios de interacción con neurofilamentos y secuencias de retención en el retículo endoplásmico que participan, respectivamente, en el posicionamiento y transporte de los NMDA en la membrana (Hoffman et al 2003)

En el procesamiento del exón 22, el uso variable de un sitio aceptor hace posible la expresión, alternativamente, de dos unidades diferentes, C2 o C2', de 38 aminoácidos. Tanto C2 como C2' contienen dos secuencias consenso para la fosforilación por PKC. En la unidad C2', los aminoácidos del extremo C-terminal constituyen un dominio de unión a proteínas PDZ (Postsynaptic Density-95/Discs Large/Zonula Occludens-1-binding Motif), que permiten la asociación del NMDAR en clusters sobre la superficie celular (Okabe et al 1999, Scott et al 2001). Además, mediante la interacción con las proteínas PDZ, estos dominios pueden enmascarar las señales de retención en el retículo endoplásmico presentes en C1, facilitando el transporte y ensamblaje de los receptores NMDA a la membrana. En algunas variantes C2', la pérdida adicional de la unidad C1, y la consecuente eliminación de las secuencias de retención en el retículo endoplásmico promueven aún más la llegada a la membrana de estas formas de NR1. Los exones C2 y C2' intervienen en el transporte, inserción y mantenimiento de la subunidad NR1 en la membrana sináptica y conjuntamente con las N1 y las C1 influyen la funcionalidad del receptor NMDA (Logan et al 1999). Por otro lado, se ha demostrado que el procesamiento en el sitio C2/C2' está regulado por la actividad sináptica y que existe, por tanto, una relación entre el nivel de actividad, el procesamiento y el tráfico de subunidades a la membrana durante la modificación de sinapsis excitatorias. En situaciones patológicas, como la sección experimental del nervio óptico, se han demostrado cambios en la expresión de las isoformas de NR, incrementándose diferencialmente las isoformas NR1b, que aportan a las células afectadas una ventaja significativa para su supervivencia (Kreutz et al 1998). Resulta evidente que el tráfico y ensamblaje de las subunidades del receptor NMDA son procesos finamente regulados y que, particularmente en el caso de NR1 constituyen pasos críticos para su expresión en la membrana plasmática.

Subunidades NR2

La diversidad en las propiedades farmacológicas y biofísicas de los receptores NMDA nativos, que influyen directamente en la duración de las corrientes excitatorias postsinápticas, dependen en gran parte de la naturaleza de las subunidades NR2 presentes en el receptor. Por dicho motivo las NR2 son consideradas subunidades moduladoras (Monyer 1994, Vicini 1998). Por ejemplo, la presencia de una subunidad NR2A versus una NR2B altera la duración de las corrientes sinápticas, y la presencia de diferentes subunidades NR2 en un receptor afecta la afinidad de dicho receptor por agonistas y antagonistas (Kutsuwada et al 1992).

En general, todas las subunidades NR2 presentan un dominio intracelular C-terminal (fundamental para la función y localización de estas subunidades en la membrana sináptica) mucho más extenso que el de las NR1. Además tienen en sus aminoácidos del extremo C-terminal dominios de interacción con proteínas PDZ, que no solo facilitan la asociación de los receptores NMDA en clusters sobre la superficie celular, sino que, al igual que en los NR1, pueden contribuir a su estabilidad al enmascarar los dominios de internalización. En consecuencia, las subunidades NR2 (NR2A y NR2B) modulan la cantidad de receptores NMDA funcionales en la superficie celular, aunque no modifican directamente la intensidad de la corriente mediada por los NMDA (Prybylowski et al 2002).

Subunidades NR3

Se conocen dos isoformas de subunidad NR3, llamadas NR3A y NR3B. En ratas, la subunidad NR3A al parecer se expresa primariamente durante el desarrollo, y se expresa mayoritariamente a los 7-10 días tras el nacimiento, predominando en cortex e hipocampo (Al-Hallaq et al 2002). Al parecer actúa como un modulador negativo de la actividad del NMDA, formando complejos glutamatérgicos con subunidades NR1 y NR2.

DISTRIBUCIÓN DE LA SUBUNIDADES DE LOS RECEPTORES NMDA

Los receptores NMDA se encuentran ampliamente distribuidos por todo el cerebro, aunque predominan en el prosencéfalo (cerebro anterior). Los niveles más altos se encuentran en la región CA1 del hipocampo.

La distribución de cada subunidad ha sido estudiada mediante técnicas histoquímicas de hibridación in situ (Mori et al 1995, Laurie et al 1995). El ARNm de las NR1 está abundantemente distribuido por todo el cerebro. Al estudiar la localización mediante técnicas de inmunomarcaje de anticuerpos contra residuos aminoácidos de las C-

terminales, se han localizado preferentemente en las zonas post-sinápticas, en las vesículas sinápticas y en las dendritas asociadas. Las isoformas NR1-1a y NR1-2 se distribuyen abundantemente por todo el cerebro, excepto en el colículo inferior. Las NR1-1b y las NR1-4 se localizan en lugares similares en determinadas áreas: cortex parietal, CA3 del hipocampo, tálamo, colículo inferior, y células granulosas cerebelosas. Las NR1-1 siguen un patrón complementario a las NR1-4 en todo el cerebro. Estas últimas se expresan abundantemente en el tálamo y colículo inferior. En contraste, las NR1-3 son escasas en todas las estructuras.

Por su parte, las cuatro subunidades NR2 se distribuyen en diferentes patrones regionales. El ARNm de las NR2A se distribuye ampliamente por todo el territorio cerebral, pero predomina en el córtex cerebral, hipocampo, y cerebelo. Las NR2B se encuentran selectivamente en el prosencéfalo, con una expresión máxima de su ARNm en el córtex cerebral, hipocampo, septo, caudado-putamen (estriado), y bulbo olfatorio. Las NR2C se expresan predominantemente en la capa de células granulosas del cerebelo, con una débil representación en el bulbo olfatorio y el tálamo. Bajos niveles de NR2D se han detectado en el tálamo, tronco del encéfalo y bulbo olfatorio. Las NR2C y NR2D se han encontrado en un subgrupo de neuronas hipocámpales, probablemente en interneuronas (Monyer et al 1994).

A lo largo del crecimiento y desarrollo existen cambios en la abundancia de las diferentes NR2. Así, las NR2B y las NR2D son más prominentes durante el periodo prenatal. Las NR2A y las NR2C no se han detectado antes del nacimiento (Watanabe et al 1992). El cambio más dramático es el cambio de subunidades NR2B, que se expresa abundantemente en el periodo embrionario, y que son totalmente sustituidas por NR2C en las células granulosas cerebelosas. Dado que las propiedades funcionales de los receptores NMDA, como el bloqueo por el Mg^{2+} y la cinética de despolarización de la membrana dependen de cuáles de las subunidades NR2 conformen el receptor, es razonable que los diferentes patrones de expresión de los genes NR2 están diseñados para ajustar exactamente sus funciones tanto en el cerebro embrionario como en el adulto (Tang et al 1999).

CARACTERÍSTICAS ELECTROFISIOLÓGICAS DEL RECEPTOR NMDA

El bloqueo por Mg^{++} dependiente de voltaje es mayor a los potenciales negativos en los receptores NR1a/NR2A y NR1a/NR2B (2,4 y 2,1 μ M), comparados con los receptores NR1a/NR2C y NR1a/NR2D (14,2 y 10,2 μ M). Por tal motivo los diferentes

subtipos de receptores NMDA son activados a distintos rangos de potencial de membrana (Jatzke et al 2002). La constante de tiempo de cierre de estos heterómeros (NR1a/NR2A) es rápida, siendo de 3 a 4 veces menor que la de los heterómeros NR2B o NR2C, y hasta 40 veces menor que la de los heterómeros de la subunidad NR2D (Monyer et al 1994); que además se distinguen por ser canales de más alta conductancia que los formados por las subunidades NR1a/NR2C y NR1a/NR2D.

La expresión de las subunidades NR1a y NR2B se correlaciona con la distribución de los receptores de NMDA con alta afinidad por los agonistas (Erreger et al 2007). Como se ha comentado en el apartado anterior, en la rata la subunidad NR2B se expresa predominantemente en el cerebro anterior de los neonatos, así como en el estriado medio y en el cerebelo, del que prácticamente desaparece en los adultos (Goebel et al 1999). Los estudios funcionales demuestran que los receptores que incluyen esta subunidad presentan una mayor afinidad por los co-agonistas Glu y glicina que los receptores NR1a/NR2A. Los heterómeros NR1a/NR2B presentan una mayor permeabilidad e influjo de Ca^{++} y se activan a menores concentraciones de Glu que los heterómeros NR1a/NR2A. La inserción de la subunidad NR1a con la subunidad NR2A y NR2B, forma receptores altamente sensibles al bloqueo por Mg^{++} , cuya activación precisa una mayor despolarización (Cull-Candy et al 2001).

Estudios en células granulares cerebelares de ratones para la subunidad NR2C demostraron un aumento en las corrientes postsinápticas excitatorias, comprobando la baja probabilidad de apertura de los receptores NR1/NR2C y el rápido decaimiento de las corrientes (Cathala et al 2000). Por el contrario, en comparación con los heterómeros NR1a/NR2A, NR1a/NR2B y NR1a/NR2C, la subunidad NR2D presenta una mayor afinidad al Glu, es poco sensible al bloqueo por Mg^{++} , y el tiempo de cierre del canal de los heterómeros donde está presente es muy lento, por lo que esta subunidad desempeña un papel muy importante en el daño neuronal excitotóxico (Lester et al 1990). Además, esta actividad podría resultar en una lenta pero prolongada entrada de Ca^{++} en la célula, coordinando la actividad pre y postsináptica permitiendo un grado de flexibilidad temporal para la formación de ciertas sinapsis en el desarrollo, que es la etapa de mayor expresión de la subunidad NR2D (Monyer et al 1994).

CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS DEL RECEPTOR NMDA

La regulación funcional del receptor NMDA es muy compleja, y se realiza mediante diversos mecanismos que se interrelacionan. El receptor NMDA contiene un lugar de

reconocimiento para el glutamato (Glu), otros dos dentro del canal iónico en los que se unen al magnesio y los anestésicos disociativos del tipo de la fenciclidina (PCP), y sitios moduladores para la glicina, poliaminas y cinc, acoplados alostéricamente a diferentes localizaciones del receptor (figura 2). En los lugares moduladores, la glicina y las poliaminas aumentan la respuesta del receptor a sus agonistas, mientras que el cinc, el magnesio y los anestésicos disociativos son inhibidores. La estimulación del lugar de glicina parece ser un requerimiento absoluto para que se active el receptor NMDA, por lo que se considera a este aminoácido como un coagonista del glutamato (Monaghan et al 1989, Scatton et al 1991).

El receptor NMDA sólo puede ser activado por el Glu bajo unas rígidas condiciones fisiológicas. La activación del receptor se asocia a un cambio de conformación de la proteína receptora, que abre el poro y permite a los cationes cruzar la membrana bajo la fuerza de sus gradientes electroquímicos, resultando en una despolarización de la membrana y una excitación neuronal (Scatton et al 1991). En el caso del canal iónico NMDA, es altamente permeable al sodio y potasio (al igual que el resto de RG ionotrópicos), así como al ión cesio (Cs^+).

Un requisito imprescindible para la activación de los receptores NMDA es la despolarización de la membrana. Un cambio positivo en el potencia transmembrana puede facilitar que el canal iónico del receptor se abra, expidiendo iones Mg^{2+} que bloquean el canal hasta su salida. Esta propiedad es fundamental en el papel que juega el receptor NMDA en la memoria y aprendizaje, y se ha sugerido que este canal es un substracto bioquímico del aprendizaje Hebbiano (teoría sobre la plasticidad sináptica en la que la eficacia de la misma se vería reforzada por estímulos repetitivos y simultáneos a nivel postsináptico), donde puede actuar como un factor coincidente para la despolarización de la membrana y la trasmisión sináptica.

La co-agonista glicina

El efecto de la glicina es detectable a bajas concentraciones, y no es simplemente un potente potenciador de la respuesta NMDA, sino un elemento imprescindible para la apertura del canal NMDA, de manera que actúa como co-agonista (Johnson et al 1987). Dicha acción co-agonista no es bloqueada por su antagonista estrictina. Las respuestas NMDA son detectables en cultivos y preparaciones de cortes de cerebro debido a la presencia de glicina endógena.

La sustitución de los residuos NR2B en la región que precede a la región M1 y en el bucle que separa M3 y M4 causa una marcada disminución en la afinidad del glutamato sin

afectar a la respuesta a la glicina. Sin embargo, la mutación de las regiones correspondientes en la subunidad NR1 reduce fuertemente la potencia de la glicina sin afectar de forma significativa la unión al glutamato.

Permeabilidad del Ca²⁺

La mayor diferencia con respecto a los canales no-NMDA son debidas a las propiedades de permeabilidad para el Ca²⁺ y el Mg²⁺. El canal es altamente permeable al Ca²⁺ (Mayer et al 1984), y se cree que el aumento intracelular de calcio es el principal responsable de sus efectos sobre la plasticidad neuronal y la neurotoxicidad (Nakanishi et al 1992).

Bloqueo voltaje-dependiente por el Mg²⁺

En el medio externo que contiene concentraciones fisiológicas de Mg²⁺ (aproximadamente 1mM), la corriente mediada por el receptor NMDA es entre -20 y -30 mV, y se reduce, a pesar de incrementar la fuerza conductora eléctrica, a potenciales más hiperpolarizados. Durante el potencial de reposo, el canal catiónico es bloqueado de forma dependiente del voltaje por iones de magnesio, que son desplazados fuera del canal cuando se produce la despolarización de la membrana. Así, sólo estímulos muy fuertes o repetidos permitirán la activación del receptor. El potencial postsináptico que se produce entonces tiene un inicio más lento y una duración mayor que el de otros receptores ionotrópicos de glutamato. Unas bombas dependientes de energía son capaces de restaurar el balance iónico modificado por la acción del receptor NMDA.

El bloqueo por el Mg²⁺ del canal puede explicarse si se asume que el poro del canal tiene una amplia boca cercana al espacio extracelular, en la cual los cationes hidratados penetran fácilmente, y una estrecha zona de paso localizada profundamente en la membrana, a través de la cual sólo los iones Mg²⁺ deshidratados pueden pasar. La hiperpolarización de la membrana aumenta la probabilidad de que el Mg²⁺ ocupe la entrada de la región de constricción, con lo cual se incrementa el grado de bloqueo por dicho ión.

La intensidad del bloqueo por el Mg²⁺ del canal no depende de un solo factor. Como ya se ha comentado, esta propiedad difiere dependiendo de la subunidad concreta NR2 coexpresada con la NR1. Así, las combinaciones NR1-NR2A y la NR1-NR2B son más sensibles al Mg²⁺ que los canales NR1-NR2C y NR1-NR2D (Kutsuwada et al 1992).

La asparagina, determinante molecular de la permabilidad iónica

Tanto en las subunidades NR1 como en las NR2A-NR2D, el aminoácido asparagina en la región M2 ocupa una posición crítica (Nakanishi et al 1992). Es en este sitio donde se

gobierna tanto la permeabilidad al Ca^{2+} como el bloqueo por el Mg^{2+} en el canal NMDA, actuando como un filtro selectivo iónico (el llamado sitio N).

El diámetro seccional de constricción en el receptor NR1-NR2A nativo se ha estimado en 0.55 nm (Villarroel et al 1995). En la subunidad NR1, reemplazar la asparagina en el sitio N por glutamina conlleva una reducción de la permeabilidad al Ca^{2+} y una disminución del bloqueo por el Mg^{2+} (Wollmuth et al 1996). Si la asparagina se reemplaza por arginina quedan totalmente abolidos tanto la permeabilidad al Ca^{2+} como el bloqueo por el Mg^{2+} (Burnashev et al 1992). En cuanto a la subunidad NR2, tanto el sitio N como el adyacente en dirección a la región C-terminal (N+1), están ocupados por asparagina. Cuando en el sitio N se reemplaza la asparagina por glicina, el poro del canal se incrementa a 0.75 nm.

Las quinasas intracelulares

Las evidencias disponibles hasta el momento sugieren que bajo condiciones normales el calcio atraviesa la membrana al permeabilizarse los receptores NMDA. La PKC (proteínquinasa dependiente de calcio/fosfolípidos) modula positivamente al receptor NMDA y determina el umbral de inducción de la PLP. Diferentes investigadores (Ben-Ari et al 1992, Raymond et al 1993) demostraron que la activación de las proteínquinas A y C incrementa la actividad del receptor NMDA mediante la fosforilación del mismo. Dicha fosforilación al parecer puede ser realizada directamente por la propia PKC en neuronas hipocámpales (Tingley et al 1993 y 1997). También puede ser estimulada a través de la activación por la PKC de una proteína que no se localiza en el propio receptor, una tirosinquinasa de la familia Src, cuya activación conllevaría la tirosinafosforilación del receptor y el incremento consecuente de la corriente NMDA (Grosshans et al 2001, Chen et al 2005).

Otra quinasa, la serina-treoninquinasa Cdk5, regula la cantidad de receptores NMDA que contienen la subunidad NR2B en la membrana sináptica, lo cual afecta la plasticidad sináptica (Zhang et al 2008).

AGONISTAS, CO-AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR NMDA

Agonistas y co-agonistas de los NMDA

La activación de los receptores NMDA requiere de la unión al agonista glutamato o al aspartato (menos potente). Además, el receptor también precisa la unión a la coagonista glicina, para una apertura eficiente del canal iónico que forma parte del receptor.

La D-serina también es coagonista NMDA, probablemente de mayor potencia incluso que la glicina (Shleper et al 2005). La D-serina está producida por la serina racemasa, y es enriquecida en las mismas áreas que los NMDA. La eliminación de la D-serina puede bloquear la neurotransmisión excitatoria mediada por los NMDA en muchas áreas. Recientemente, se ha objetivado que la D-serina es sintetizada abundantemente en las células gliales, sugiriendo un papel para la D-serina derivada desde la glia en la regulación del receptor NMDA.

Antagonistas NMDA

Diversos antagonistas NMDA se utilizan como anestésicos en animales y a veces en los seres humanos, y en ocasiones son consumidos como drogas recreativas debido a sus propiedades alucinógenas.

Los anestésicos disociativos ketamina y fenciclidina (PCP), y el anticonvulsivante y neuroprotector dizocilpina (MK-801) son antagonistas no competitivos de la función del receptor NMDA. Para ello se unen al lugar llamado PCP, situado dentro del canal iónico, al que sólo pueden acceder cuando el canal permanece abierto. Así, tanto para que ejerzan su efecto, como para que puedan anularlo, tiene que actuar primero un agonista del receptor (Scatton et al 1991). La amantadina y la memantina, así como el antitusígeno dextrometorfano y su metabolito más potente dextrorfano, también son antagonistas en este lugar, aunque poseen menor afinidad. El sulfato de pregnenolona interacciona positivamente con el receptor NMDA de manera no competitiva, posiblemente en un sitio alostérico específico diferente de los ya conocidos.

Otros antagonistas NMDA bien conocidos son: el etanol, el óxido nitroso (NO), el riluzol, el Xenon, el plomo y el cannabinoide HU-211. Opioides con acción antagonista son la metadona, el dextropropoxifeno, el tramadol, la ketobemidona y la ibogaína.

La figura 2 ilustra los sitios de unión al receptor de algunos de estos compuestos.

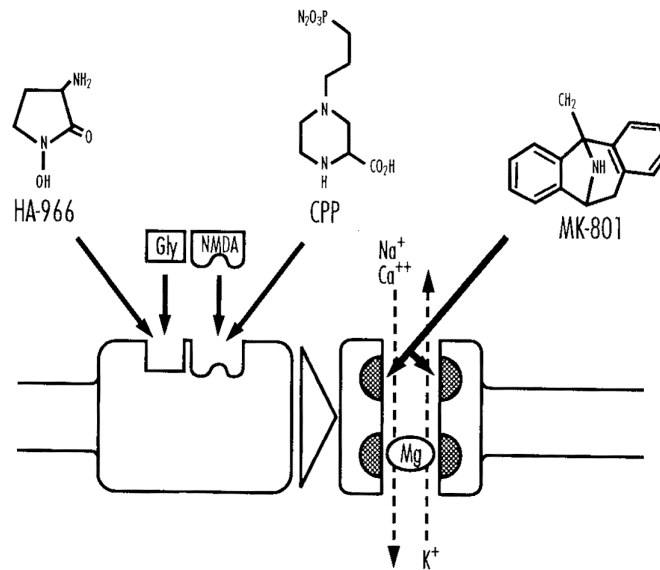


Figura 2. Sitios de unión en el complejo-receptor NMDA a la glicina (Gly) y NMDA, agonistas; dizocilpina (MK-801), magnesio (Mg) y fenciclidina (CPP), antagonistas; y HA-966, agonista parcial

Moduladores del receptor NMDA

Además de los ya descritos, hay una serie de compuestos, tanto endógenos como exógenos, que modulan la funcionalidad del receptor NMDA (Huggins et al 2005):

- Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ no sólo pasan a través del canal iónico, sino que también modulan la actividad del receptor
- El Zn²⁺ bloquea la corriente NMDA de una forma no competitiva y voltaje-independiente
- El Pb²⁺ actúa como un potente antagonista NMDA.
- Las poliaminas no activan directamente los receptores NMDA, sino que actúan como potenciadoras o inhibidoras de las respuestas mediadas por el glutamato.
- Los aminoglicósidos tienen efectos similares a las poliaminas, y esto puede explicar su efecto neurotóxico.

- La actividad de los receptores NMDA es altamente sensible a cambios en la concentración de iones H^+ , y parcialmente inhibida por la concentración ambiental de H^+ en condiciones fisiológicas. El nivel de inhibición se reduce intensamente en los receptores en los que existe la subunidad NR1A, la cual contiene el Exon 5 cargado positivamente. El efecto de dicho exón puede ser imitado por poliaminas y aminoglicósidos, lo que explicaría su modo de acción.
- La función NMDA está fuertemente regulada por la reducción y oxidación químicas, via “sitio modulador redox”. A través de dicho sitio, los reductores aumentan dramáticamente la actividad del canal NMDA, mientras que los oxidantes revierten los efectos de los reductores o deprimen las respuestas nativas. En general, los receptores NMDA son modulados por agentes redox endógenos, como el glutatión, el ácido lipoico, y el nutriente esencial pirroloquinolinquinona.

La diversidad farmacológica de los receptores NMDA está determinada por la composición de sus subunidades. Las combinaciones NR1/NR2A y NR1/NR2B son más sensibles a los bloqueantes del interior del canal (Mg^{2+} , MK-801), que las combinaciones NR1/NR2C y NR1/NR2D. Sin embargo, la sensibilidad a la fenciclidina (PCP) y ketamina es similar entre ellos (Ikeda et al 1992).

Toxicidad de los antagonistas del receptor NMDA

Los antagonistas del canal iónico, como los anestésicos disociativos o la dizocilpina, pueden inducir efectos psicoticomiméticos, con agitación y alucinaciones, trastornos del comportamiento con estereotipias motoras, ataxia, alteraciones de la memoria, sedación, depresión respiratoria, prolongación del intervalo Q-T, y modificaciones de la tensión arterial (Willets et al 1990).

La dizocilpina o MK-801, y otros antagonistas del canal iónico causan una vacuolarización neuronal en la corteza cingular posterior y el retrosplenio del cerebro de la rata, que a dosis altas es irreversible. Las alteraciones neuropatológicas pueden deberse a que causan un excesivo metabolismo celular en las citadas regiones (Duval et al 1992). En estos mismos grupos neuronales también inducen la expresión de la proteína HSP72, un indicador de lesión celular que persiste durante una o dos semanas. Algunos autores han sugerido que los efectos psíquicos que originan los antagonistas del canal iónico pueden estar relacionados con la producción de estas lesiones (Sharp et al 1992). Se ha observado que los anticolinérgicos muscarínicos, los barbitúricos, y en parte las benzodiazepinas,

pueden contrarrestar la lesión morfológica y la activación conductual causada por estos fármacos (Olney et al 1991).

Los antagonistas competitivos también originan lesiones neuronales y trastornos clínicos similares, aunque a dosis mucho más elevadas que los antagonistas del canal iónico, que las provocan a las dosis utilizadas para obtener sus efectos terapéuticos (Willetts et al 1990). La diferencia puede radicar en que los antagonistas del canal iónico son más lipofílicos y atraviesan mejor la barrera hematoencefálica. Aunque es posible que muchos de estos fármacos no sean viables clínicamente, durante estos últimos años se ha dedicado gran atención a los antagonistas NMDA, como una posible opción terapéutica en algunas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer.

MECANISMOS BÁSICOS Y FUNCIONALES DEL RECEPTOR NMDA

Funciones fisiológicas

Los receptores del glutamato han sido involucrados en el funcionamiento de importantes mecanismos fisiológicos, desde el procesamiento de la actividad sensorial, la coordinación de los patrones motores, las funciones autonómica y neurotrófica, hasta los procesos cognoscitivos, el aprendizaje y la memoria (Gasic et al 1992, Watkins et al 1990). La mayor parte de las informaciones de origen sensorial o cortical son transmitidas hacia las estructuras subcorticales por vías que utilizan a los AAE. Estos receptores también participan en la modificación de las conexiones sinápticas durante el desarrollo y a lo largo de toda la vida, manteniendo relaciones complejas con los factores neurotróficos. Promueven el crecimiento y diferenciación normal de las neuronas y la eliminación de las que no son necesarias, tanto por mecanismos excitotóxicos como por interrupción o interferencia del soporte neurotrófico (Monaghan et al 1989, Shaw et al 1993).

Los receptores NMDA participan en funciones tales como la generación del ritmo respiratorio, el control de la tensión arterial, la formación del patrón de locomoción, el desarrollo y procesamiento de señales de los sistemas visual, olfativo, auditivo, vestibular y somatosensorial, y la regulación de la función neuroendocrina, incluyendo el inicio de la pubertad (Monaghan et al 1989, Gasic et al 1992). Son esenciales en algunos tipos de aprendizaje, sobre todo en aquellos que son dependientes de la orientación espacial.

La función fisiológica de los receptores NMDA está íntimamente ligada a su estructura molecular. Tal y como se ha comentado previamente, el receptor maduro posee diferentes sitios de unión (figura 2):

- En la superficie exterior celular: dos sitios para agonistas, uno para los AAE (glutamato y aspartato), y para la glicina. Ambos sitios pueden ser ocupados antes que el canal se abra, provocando una apertura del canal suficiente para el paso de algunos iones. El tercer sitio de unión en la superficie exterior del receptor es para los iones de zinc, que bloquean el canal mientras están presentes. Además hay un sitio de unión para las poliaminas (espermina y espermidina), que incrementan la capacidad del glutamato y la glicina de abrir los canales iónicos
- En el interior del canal del receptor se encuentra el sitio para la fenciclidina (PCP), donde pueden unirse la propia fenciclidina, la ketamina, la dizocilpina (MK-801), el dextrometorfano y el dextrorfano. El canal debe encontrarse totalmente abierto para que estas drogas puedan acceder sus sitios de unión.
- El sitio de unión del magnesio está presente tanto en la superficie exterior como la interior del receptor.

Los receptores NMDA son únicos por diversas razones (Marco-Igual 1995b). A diferencia de otros receptores, requieren dos agonistas (glutamato o aspartato, y glicina) antes de que el canal se abra. Una vez estos dos agonistas se han unido a sus sitios de unión, el canal se abre lo suficiente como para permitir la entrada de iones potasio, y el receptor NMDA puede así operar de forma similar a como actúan los receptores AMPA y kainato, tal y como se reproduce en la figura 3.

La más importante y distintiva característica de los receptores NMDA, sin embargo, son los procesos que ocurren posteriormente (figuras 4 y 5). Normalmente, el magnesio se localiza en su sitio específico en la zona de apertura del canal, y se mantiene unido por fuerzas electrostáticas. Este ión arrastra al potasio a entrar en el canal, pero previene la entrada de calcio, posiblemente debido a su medida. Una vez la célula se ha activado lo suficiente, el potencial celular ha aumentado tanto como para impedir que el magnesio cierre el canal. En ese momento el ión calcio puede entrar (y salir, aunque esto no siempre ocurre) a través del canal NMDA totalmente abierto. Una vez dentro, el calcio provocará una serie de respuestas que incrementan la intensidad de la sinapsis.

En este punto reside la excepcionalidad del receptor NMDA: Cuando la neurona está moderadamente activada, el canal NMDA puede abrirse parcialmente, pero el magnesio permanecerá en su sitio de unión. Sin embargo, cuando la neurona sea rápida y potentemente activada, el magnesio será arrastrado, y el calcio podrá penetrar en la célula, incrementando la intensidad de la sinapsis. Este proceso de incremento sináptico de

intensidad se llama Potenciación a Largo Plazo (PLP), y es uno de los mecanismos mediante los cuales las neuronas pueden cambiar su funcionamiento y “aprender”.

Otro interesante aspecto de la acción dual del receptor NMDA es que el calcio sólo entra en la célula cuando el potencial de membrana está suficientemente bajo y la sinapsis está activada; por tanto han de coincidir dos tipos de señales, una intracelular y una sináptica, por lo que el receptor NMDA está idealmente construido para ayudar a la neurona a “aprender” asociaciones entre dos señales estimulantes.

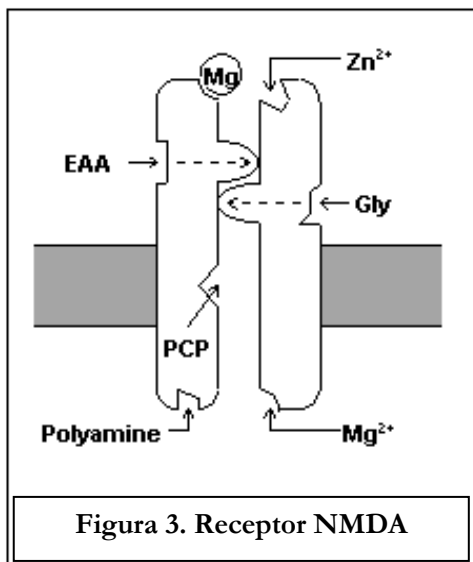


Figura 3

Sitios de unión en el receptor NMDA:

-Tres en la superficie exterior celular, para los AAE (glutamato- Glu- y aspartato, en el esquema EAA), para los iones de zinc, que bloquean el canal, y para la glicina (Gly)

-Uno en el interior del canal, para la fenciclidina (PCP), ketamina, dizocilpina (MK-801), dextrometorfano y dextroanfano.

-El magnesio (Mg^{2+}) tiene sitios de unión en la superficie exterior y la interior.

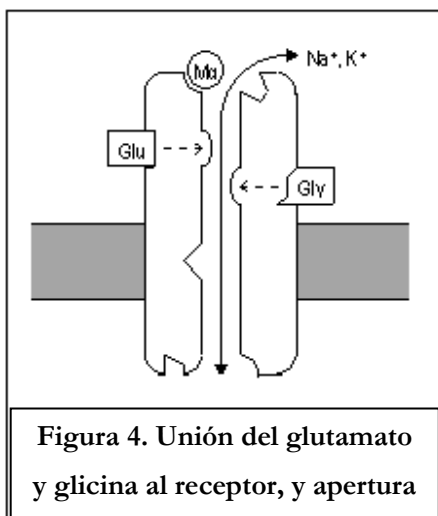


Figura 4

A diferencia de otros receptores, los NMDA requieren dos agonistas (glutamato o aspartato, y glicina) antes de que el canal se abra. Una vez estos dos agonistas se han unido a sus sitios de unión, el canal se abre lo suficiente como para permitir la entrada de iones potasio.

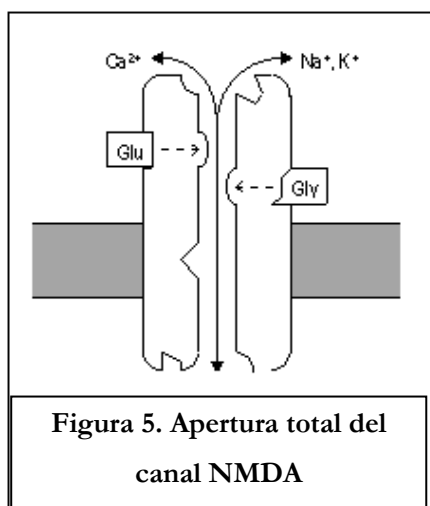


Figura 5

El magnesio se localiza en su sitio específico en la zona de apertura del canal, y previene la entrada de calcio. Si la célula se activa suficientemente el magnesio no consigue cerrar el canal, y en consecuencia el ión calcio puede entrar. Una vez dentro, el calcio provocará una serie de respuestas que incrementan la intensidad de la sinapsis.

Figura 5. Apertura total del canal NMDA

Potenciación y depresión a largo plazo (PLP/DLP)

En neurociencia, la potenciación a largo plazo (*long-term potentiation*, o LTP en inglés) es una intensificación duradera en la transmisión de señales entre dos neuronas que resulta de la estimulación sincrónica de ambas (Cooke et al 2006) Es uno de los varios fenómenos que subyacen a la plasticidad sináptica, la capacidad de la sinapsis química de cambiar su fuerza. Puesto que se piensa que los recuerdos están codificados por modificaciones de la fuerza sináptica, se considera ampliamente al LTP como uno de los mecanismos celulares principales que subyace al aprendizaje y la memoria (Bliss et al 1993).

La LTP comparte muchos rasgos con la memoria a largo plazo, haciéndola un atractivo candidato para un mecanismo celular del aprendizaje. Por ejemplo, la LTP y la memoria a largo plazo se desencadenan rápidamente, dependiendo cada una de ellas en la síntesis de nuevas proteínas, teniendo ambas propiedades de asociatividad, y pudiendo ambas durar muchos meses. La LTP puede explicar muchos tipos de aprendizaje, desde el relativamente sencillo condicionamiento clásico presente en todos los animales, a la cognición, una forma de conducta más compleja y de alto nivel que se observa en humanos.

A nivel celular, la LTP estimula la transmisión sináptica. Mejora la capacidad de dos neuronas, una presináptica y otra postsináptica de comunicarse entre ambas a través de la sinapsis. El mecanismo molecular preciso de esta intensificación de la transmisión aún no ha sido establecido completamente, en parte porque el LTP está dirigido por múltiples mecanismos que varían entre especies y región cerebral. En la forma mejor comprendida de LTP, la intensificación de la comunicación se lleva a cabo predominantemente mediante

la mejora de la sensibilidad celular postsináptica a señales recibidas por la célula presináptica. Estas señales, en forma de moléculas neurotransmisoras son recibidas por receptores neurotransmisores presentes en la superficie de la célula postsináptica. La LTP mejora la sensibilidad de la célula postsináptica al neurotransmisor en gran parte por el incremento de la actividad de los receptores existentes y por el incremento del número de receptores en la superficie celular postsináptica.

La LTP fue observada inicialmente por Terje Lømo en 1966 en conejos anestesiados para explorar el rol del hipocampo en la memoria a corto plazo. Estos experimentos fueron llevados a cabo por la estimulación de las fibras presinápticas de la vía perforante y la detección de la respuesta de una colección de células postsinápticas del giro dentado. Como era esperado, un pulso simple de estimulación eléctrica a las fibras de la vía perforante causó un potencial postsináptico excitatorio en células del giro dentado. Lo que Lømo inesperadamente observó fue que la respuesta de la célula postsináptica a este estímulo de pulso simple podía ser potenciada por un largo período de tiempo si primero entregaba un tren de estímulos de alta frecuencia a la fibra presináptica. Cuando tal tren de estímulos era aplicado, el subsecuente estímulo de pulso simple disparaba potenciales excitatorios más fuertes y prolongados en la población de células postsinápticas. Este fenómeno, por el que un estímulo de alta frecuencia podía producir un potenciamiento de larga vida en la respuesta de la célula postsináptica al subsecuente estímulo de pulso simple, fue llamado "potenciación a largo plazo".

La PLP es importante en el hipocampo y la amígdala, que participan en el procesamiento de las primeras fases de la formación de la memoria, presumiblemente en su consolidación, y sólo en el almacenamiento de algunos tipos de memoria, como la olfatoria y la espacial (Izquierdo et al 1991, McHugh et al 1996). La mayoría de los experimentos sobre el mecanismo de la PLP se realizan actualmente con las sinapsis de la colateral de Schaffer y las neuronas piramidales de CA1 (Monaghan et al 1989, Bliss et al 1993).

La PLP en el hipocampo es probablemente la responsable de la memoria a corto plazo, y es un proceso reversible. La capacidad de aprendizaje puede estar de hecho directamente relacionada con el número de receptores NMDA en el hipocampo, donde la memoria a medio plazo puede acumularse (Tang et al 2001). La memoria a largo plazo puede generarse a través de cambios más permanentes en la expresión genética y la modulación sináptica. Los receptores NMDA, que son esenciales para la inducción de la PLP, pero no para su mantenimiento, actuarían de manera sinérgica con los receptores

muscarínicos y betaadrenérgicos, y de manera opuesta a los GABA A (Izquierdo et al 1991).

La inducción de la PLP en la región CA1 del hipocampo depende de cuatro factores postsinápticos: despolarización postsináptica, activación de receptores NMDA, entrada de Ca^{2+} y activación por el Ca^{2+} de varios sistemas de segundos mensajeros en la célula postsináptica. La estimulación tetánica de las vías excitadoras monosinápticas del hipocampo mediante breves cargas de alta frecuencia causa un aumento brusco y sostenido de la eficiencia de la transmisión sináptica, que puede ser desencadenado en milisegundos y durar hasta varios días (Monaghan et al 1989, Bliss et al 1993).

Recientes estudios permitieron aclarar los mecanismos responsables de la expresión de la PLP, o sea, de qué modo ésta hace que las sinapsis estén fortalecidas durante periodos prolongados. La explicación más probable es que la PLP se origina en cambios en la sensibilidad de la célula postsináptica al glutamato, las sinapsis excitadoras pueden regular dinámicamente sus receptores glutamatérgicos postsinápticos e incluso pueden agregar receptores AMPA nuevos a sinapsis “silenciosas” que no tenían receptores AMPA con anterioridad. Al parecer la expresión o el mantenimiento de la PLP se deben a esta inserción de receptores AMPA en la membrana postsináptica.

La PKC (proteínquinasa dependiente de calcio/fosfolípidos) modula positivamente al receptor NMDA y determina el umbral de inducción de la PLP. Por ese motivo, los receptores metabotrópicos y ciertos neurotransmisores (como los opioides y la acetilcolina) que desempeñan un papel en el proceso de la memoria pueden modular a los receptores NMDA, a través de su influencia sobre la PKC. A su vez este enzima, como otros sensibles al calcio, intervendría como participante en las modificaciones persistentes de la potenciación sináptica.

La PLP dependiente de los receptores NMDA posee las siguientes características:

1. Entrada (*input*) específica. Una vez inducida, la PLP en una sinapsis no se reparte entre otras sinapsis. Sólo se propaga a otras sinapsis siguiendo las reglas de asociabilidad y cooperatividad.
2. Asociabilidad. El término se refiere a la observación de que aunque una estimulación débil de una vía simple es insuficiente para la inducción de la PLP, la estimulación potente simultánea de otra vía inducirá la PLP en ambas vías.

3. Cooperatividad. La PLP puede ser inducida tanto por una fuerte estimulación tetánica en una simple vía sináptica, como por la cooperación de estimulaciones débiles en varias.
4. Persistencia. Dura desde minutos hasta varios meses, y dicha persistencia es la que diferencia la PLP de otras formas de plasticidad sináptica.

También se ha demostrado que el incremento de la actividad del receptor NMDA en el hipocampo produce un incremento en la PLP y una mejoría del aprendizaje espacial, estudiando una línea de ratones con una sobreexpresión de subunidades NR2B en el hipocampo (Tang et al 2001).

En cuanto a la DLP, también es considerada un elemento básico del aprendizaje (Gasic et al 1992). Los receptores glutamatérgicos están involucrados en la DLP del cerebelo y del hipocampo. Por un lado, la inducción de la DLP en las células de Purkinje del cerebelo requiere la activación de los receptores AMPA y metabotrópicos, junto con la despolarización en presencia del calcio. Por otro lado, para el mantenimiento de la DLP desencadenada por los receptores NMDA en el sector CA1 del hipocampo, se requiere la actividad de proteínas fosfatasa, que pueden estar coordinadas con la acción de las proteinquinasas, esenciales en la PLP.

Activación propagada (*kindling*)

Es un cambio progresivo y permanente de la función cerebral provocado por la aplicación periódica a estructuras límbicas de una estimulación eléctrica inicialmente subconvulsiva (Morimoto et al 1992). La activación repetida de los receptores NMDA es importante en su desarrollo, aunque el mecanismo desencadenante primario puede ser un colapso de los sistemas inhibidores GABAérgicos, que facilita la estimulación repetida de los receptores NMDA y los canales del calcio dependientes del voltaje, con la consiguiente entrada de calcio en la célula y la activación de sistemas de segundo mensajero como el de la PKC, la inducción de *c-fos* y una reorganización sináptica. Este modelo, que muestra analogías con la PLP, se cree está implicado en procesos de plasticidad neuronal y en la génesis de la epilepsia y de algunos trastornos mentales, como la psicosis maniaco-depresiva.

Depresión propagada

Se trata de una respuesta fisiológica exagerada y prolongada, mediada por el glutamato, constituida por una onda de activación neuronal, seguida por una supresión de su actividad, que se extiende lentamente por la corteza cerebral, o por otras estructuras del

SNC. Si el área es suficientemente grande, y la acumulación extracelular de glutamato es masiva y abrupta, se inicia la depresión propagada (Welch et al 1993). Los receptores NMDA tienen un papel importante en el desencadenamiento del proceso, que es bloqueado por sus antagonistas. Este mecanismo es básico en la génesis de las crisis epilépticas, la isquemia cerebral y los episodios migrañosos (McLachlan et al 1992).

FARMACOLOGÍA DE LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Transporte y liberación presináptica de los AAE

El proceso de transporte del L-glutamato dentro de los compartimentos glial y neuronal es de gran importancia, ya que se trata del principal mecanismo para modular su liberación, terminar la señal excitadora, reciclar el transmisor y mantener su concentración por debajo de valores tóxicos (Monaghan et al 1989). Se han aislado los ADN complementarios que codifican tres sistemas de transporte de los AAE, denominados GLAST 1, GLT-1 y EAAC1. Los dos primeros predominan en células gliales, mientras que el tercero ha sido hallado en las neuronas y los tejidos periféricos. La tabla 2 recoge los principales agentes que modifican la liberación y transporte de los AAE (Ben-Ari et al 1992).

La liberación presináptica de glutamato está controlada por diferentes mecanismos. Determinados receptores presinápticos, incluidos algunos receptores metabotrópicos glutamatérgicos, pueden ser activados por el glutamato sináptico en la misma sinapsis donde ha sido liberado, y también a distancia, difundiendo a través del paso sináptico. Así, diferentes agonistas de receptores metabotrópicos, como el L-2-amino-4-fosfonobutirato (L-AP4) actuarían como autorreceptores presinápticos que controlan la liberación de glutamato a dicho nivel (Turner et al 1992).

Receptores presinápticos del tipo kainato también controlan el glutamato liberado a través de la activación de una cascada de señales en la que se ven involucradas proteinquinasa A, el AMP cíclico y una adenilciclase. Así mismo, la liberación del glutamato es bloqueada por la acción de los receptores de adenosina y GABA B (Rodríguez-Moreno et al 2004).

Determinados compuestos, como el alcohol, actúan como inhibidores de la liberación presináptica del glutamato. El riluzol posee propiedades anticonvulsivantes, antiisquémicas y anestésicas (Mantz et al 1992); los barbitúricos bloquean los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) presinápticos.

La concentración permanente de AAE en la hendidura sináptica es mantenida cuidadosamente en valores subtóxicos mediante la rápida captación e inactivación de los AAE por las neuronas y la glía (Albin et al 1989). El glutamato, una vez captado, es convertido en glutamina en las células gliales, y en GABA en las células presinápticas.

<u>Mecanismo</u>	<u>Agonistas</u>	<u>Antagonistas</u>	
<u>Liberación AEE</u>		<u>Lamotigrina</u> BW1003C87 BW619C89	
	<u>Veratrina</u> Bifemelano	Riluzol (54274 RP) Etanol Pentobarbital Omega-Aga-IVA	
		<u>DL-treo-3-hidroxiaspartato</u> Dihidroquinato	
	<u>Captación AEE</u>		Ácido araquidónico pCMPS Mercurio

Tabla 2. Agentes modificadores de la liberación y captación de los AAE (adaptado de Ben Ari et al, 1992)

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Los efectos negativos del glutamato fueron observados por primera vez en 1954 por T. Hayashi, un científico japonés que observó que la aplicación directa de glutamato en el SNC provocaba una actividad ralentizada. La toxicidad del glutamato fue más tarde observada por D. R. Lucas y J. P. Newhouse en 1957, cuando, al alimentar con glutamato monosódico a crías de ratones recién nacidos, se destruyeron las neuronas de las capas internas de la retina. Más tarde, en 1969, John Olney descubrió que el fenómeno no quedaba limitado a la retina, sino que se producía en todo el cerebro, y acuñó el término excitotoxicidad. También apreció que la muerte celular estaba limitada a las neuronas postsinápticas, que los agonistas del glutamato eran tan neurotóxicos como lo era su eficiencia para activar los receptores de glutamato y que los antagonistas del glutamato podían frenar la neurotoxicidad. Posteriormente se comprobó que la aplicación tópica de glutamato monosódico en la corteza motora provocaba convulsiones tónicas (Gasic et al 1992).

Se ha relacionado la disfunción del sistema glutamatérgico con una gran diversidad de trastornos neurológicos y psiquiátricos (Marco-Igual 1995b). Sus receptores están envueltos en el inicio y la propagación de las crisis epilépticas y migrañosas, en la ansiedad y la esquizofrenia, así como en la muerte neuronal que acaece durante varios procesos neurológicos agudos, como la isquemia, la hipoglucemia y los traumatismos. En las enfermedades neurodegenerativas, como las de Huntington, Parkinson y Alzheimer, la atrofia multisistémica o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), el papel de la excitotoxicidad glutamatérgica es más controvertido que en las afecciones neurológicas agudas, ya que es difícil percibir la huella que pueda dejar en procesos crónicos, aunque parece ser un elemento esencial de los mismos (Gasic et al 1992, Choi et al 1992). Por último, los mecanismos de disfunción glutamatérgica también pueden complicar otras enfermedades neurológicas asociadas con trastornos del metabolismo energético, como las encefalopatías mitocondriales (Beal et al 1992).

Excitotoxicidad

Se utiliza el término “excitotoxicidad” para describir los efectos neurotóxicos causados por los aminoácidos excitadores (AAE), principalmente aspartato y glutamato, que destruyen las neuronas y las células gliales del área donde son aplicados, mientras que se conservan las fibras de paso y los terminales aferentes procedentes de otras áreas (Meldrum et al 1993). En la excitotoxicidad puede haber una anomalía de la función de los receptores de glutamato, una inactivación reducida del neurotransmisor, o una disminución del metabolismo energético, que haga que los AAE sean neurotóxicos a concentraciones a las que ordinariamente no lo son. Es posible que este defecto del metabolismo energético pueda sumarse a los efectos del envejecimiento normal traspasando un umbral crítico en la producción de energía (Beal et al 1992). También puede ser que algún subtipo del receptor esté alterado en una población neuronal determinada. Hay marcadas diferencias entre los patrones lesionales de las diferentes enfermedades que se relacionan con la excitotoxicidad, en las que además pueden no detectarse alteraciones significativas en algunas zonas de elevada densidad de receptores de glutamato (Albin et al 1992).

Los ácidos 3-nitropropiónico y aminooxiacético, y el MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio), que reducen el metabolismo mitocondrial, producen lesiones excitotóxicas en el núcleo estriado, bloqueables por antagonistas NMDA. Se ha intentado relacionar a agonistas glutamatérgicos endógenos, como el quinolinato, con las lesiones cerebrales de la enfermedad de Huntington, la encefalopatía hepática y el síndrome de inmunodeficiencia

adquirida. Se ha asociado de forma convincente la ingesta de agonistas glutamatérgicos exógenos con el latirismo y la intoxicación por ácido domoico (Meldrum et al 1993).

Cuando un cerebro es privado de oxígeno y glucosa, a causa de una isquemia o hipoxia cerebral, se acumulan en pocos minutos grandes cantidades extracelulares de glutamato y aspartato en la zona isquémica/hipóxica y sus alrededores, provocando una hiperexcitación de los receptores de glutamato, especialmente los NMDA. Esta acumulación de AAE es resultado de la disminución de su captación glial y neuronal, debido a un fallo de energía, y un aumento de su liberación presináptica por lisis celular. El potasio que también es liberado contribuye a aumentar aún más la liberación de AAE y a reducir su captación glial, y favorece la despolarización neuronal, ayudando a vencer el bloqueo del receptor NMDA por el magnesio (Scatton et al 1991).

Las células con riesgo de daño neurotóxico están localizadas en la llamada zona de penumbra isquémica, en la que hay una disminución de la transmisión sináptica, aunque están preservados los gradientes iónicos y la morfología celular. La depresión propagada que ocurre en esta zona limítrofe de la isquemia cerebral parece depender de la activación de los receptores NMDA y de los canales de calcio dependientes del voltaje (CCDV), que provocan la entrada de calcio y la activación del protooncogen *c-fos*. Esta zona es inicialmente viable, pero con el paso del tiempo queda incluida en la zona infartada. Antes de que esto suceda, sus neuronas pueden ser rescatadas mediante intervenciones farmacológicas (Christensen et al 1993).

Se han identificado dos componentes de la excitotoxicidad aguda, con un curso temporal y una dependencia iónica diferentes. El primero se encuentra ligado al influjo de iones de sodio a través de los receptores NMDA y AMPA/kainato, que si es persistente, también resulta en el paso de iones de cloro. El aumento de la osmolaridad celular producido causa un influjo de agua, con reblandecimiento y eventual muerte celular. El segundo componente está marcado por una desintegración celular retardada, ligada a la entrada masiva de iones de calcio a través del canal NMDA a través de mecanismos como la activación de creatinquinasa, fosfolipasas, óxido nítrico sintetasa (NOS), ornitina descarboxilasa, proteasas, endonucleasas, generación de radicales libres, inhibición de la síntesis proteica y lesión mitocondrial (Lipton et al 1993).

Durante las primeras horas de la isquemia cerebral hay una inducción aguda y transitoria de la NOS, relacionada con la activación del receptor NMDA. El NO producido puede contribuir a la excitotoxicidad reaccionando con el ión superóxido. Sin embargo, compuestos que contienen el grupo NO en estados redox alternativos, como el ión

nitrosonio, pueden tener efectos opuestos, al interactuar con el receptor NMDA, subregulándolo (Kader et al 1993). El NO tiene además un papel como mediador de la vasodilatación de las arterias cerebrales, y su deficiencia puede ser uno de los mecanismos por los que se produce el vasoespasmo tras una hemorragia subaracnoidea (Dawson et al 1992). El aumento de calcio intracelular también desencadena la liberación de ácido araquidónico, que favorece la producción de radicales de oxígeno, que contribuyen a la lesión cerebral excitotóxica.

La excitotoxicidad no se manifiesta bajo condiciones fisiológicas, debido a la potente acción de varios mecanismos de control, como el bloqueo del canal NMDA por los iones de magnesio, o las bombas iónicas dependientes de energía que restauran el desequilibrio iónico creado por la activación del receptor NMDA (Scatton et al 1991). En determinadas situaciones puede incrementarse el daño citotóxico debido a la acción de diversos fármacos. Por ejemplo, la inhibición por parte de derivados de la amilorida de la bomba de intercambio de sodio y calcio de la membrana plasmática, que extrae el calcio de las células, incrementa notablemente el daño citotóxico. En todo caso, la excitotoxicidad mediada por los AAE podría ser la vía final común que lleva a la degeneración neuronal tras procesos agudos del SNC con diferentes mecanismos etiopatogénicos, como el estado epiléptico, la hipoxia / isquemia, la hipoglucemia y los traumatismos.

Por otra parte, algunos autores abogan a favor de que alteraciones en la PLP pueden contribuir en la fisiopatología de diversas enfermedades neurológicas, incluyendo la depresión (Altamura et al 1993), la enfermedad de Parkinson (Greenamyre et al 1991), la epilepsia, la enfermedad de Huntington a través de los mecanismos de excitotoxicidad (Dure et al 1991, Beal et al 1992); en la génesis de las discinesias y distonías (Calabresi et al 1992); el síndrome maligno por neurolépticos (Kornhuber et al 1993); en la atrofia multisistémica (Plaitakis et al 1982); en la esclerosis lateral amiotrófica y trastornos relacionados (Hugon et al 1989, Shaw et al 1993); y el dolor neuropático (Cooke et al 2006). También se ha relacionado la sensibilidad al desarrollo de demencia asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con la ingesta crónica previa de etanol, a través de la interacción del tóxico con los receptores NMDA (Self et al 2004). Los autores sugieren que la exposición prolongada al etanol sensibiliza el hipocampo al efecto citotóxico del factor de transcripción Tat del VIH, de forma dependiente de la activación de los NMDA.

La afectación de la PLP, a través de la excitotoxicidad, puede también tener un papel en la enfermedad de Alzheimer y la adicción a drogas (Kauer et al 2007, Wolf et al 2003). Aunque el glutamato puede resultar neurotóxico a través de su efecto estimulador

sobre los receptores NMDA, AMPA, kainato o metabotrópicos del grupo 1 (GluR1), la selectiva muerte neuronal en la enfermedad de Alzheimer parece depender primariamente de la activación de los receptores NMDA (Greenamyre et al 1989, Rowan et al 2003, Butterfield et al 2003, Crary et al 2006).

GLUTAMATO Y ALCOHOL. INTERACCIÓN MOLECULAR Y FARMACOLÓGICA

El alcohol etílico es uno de los agentes farmacológicos más antiguos conocido por la humanidad. Sin embargo, a pesar de que el alcoholismo es una de las enfermedades psiquiátricas más comunes en los países civilizados, en la actualidad aún poseemos un conocimiento limitado de los mecanismos neuroquímicos sinápticos que dan lugar a sus diversas manifestaciones clínicas, tanto agudas como crónicas.

Las primeras hipótesis sugerían que el etanol es una droga inespecífica que actúa por perturbación de la fluidez de la doble capa lipídica de las membranas neuronales, la cual secundariamente condicionaría alteraciones en la función de las proteínas de membrana (Goldstein et al 1983). Más recientemente, sin embargo, las investigaciones se han centrado en el estudio de los efectos específicos y selectivos de este tóxico sobre las proteínas que conforman ciertos canales iónicos de membrana, entre las que se encuentran los complejos receptor-canal iónico del glutamato y el GABA. De hecho, el manejo terapéutico habitual del alcoholismo humano ha estado limitado siempre al uso de drogas que directa o indirectamente activaban los receptores GABA, con resultados subóptimos. Por este motivo durante las últimas décadas se ha estudiado con gran interés la interacción existente entre el etanol y otros grupos de neurotransmisores, ya que el etanol altera la liberación de serotonina, dopamina, norepinefrina, glutamato, y aspartato (Hoffman et al 1993).

A priori, las observaciones sobre la estructura y propiedades de los receptores NMDA sugieren que ciertas acciones del alcohol pueden ser mediadas a través de los receptores NMDA. Por ejemplo, el alcohol puede interferir con el establecimiento de la memoria y con el desarrollo neuronal a través de la inhibición de la PLP (Givens et al 1995), y, tras el cese de la ingesta crónica del tóxico, que produce dependencia física, puede provocar convulsiones. Por otra parte, existen evidencias de que los NMDA pueden ser responsables de otros aspectos en la génesis de los trastornos producidos por el alcohol, como la dependencia y el abuso. Recientemente diversos trabajos han demostrado que, dentro del grupo de receptores NMDA, existen diferencias moleculares que limitan o potencian su sensibilidad a los efectos del etanol.

En las siguientes páginas se revisan los conocimientos actuales sobre la relación entre la composición de los receptores y su sensibilidad al etanol, los mecanismos de interacción del tóxico con los receptores NMDA, así como los estudios sobre las

evidencias que relacionan los NMDA con los efectos reforzadores del etanol, los cambios funcionales de estos mismos receptores después del consumo prolongado de alcohol, y el papel de dichos cambios en el desarrollo de la dependencia alcohólica.

EFFECTOS FARMACOLÓGICOS DEL ETANOL SOBRE LAS UNIDADES RECEPTORAS NMDA EN ANIMALES

La relación etanol-NMDA posee algunas características distintivas: los mismos receptores NMDA poseen diferente sensibilidad al tóxico según el área cerebral donde se encuentran; por otra parte, el efecto provocado por el contacto con el alcohol varía en el tiempo, provocando cambios adaptativos peculiares y que sin duda se relacionan con el efecto farmacológico del etanol mediado por estos receptores.

Es muy interesante que el etanol no afecta la función NMDA en todas las regiones cerebrales por igual (Randoll et al 1996, Knapp et al 2001). Por ejemplo, el *colliculus* inferior del hipocampo sí pero no el septo lateral (Simson et al 1993) ni el tronco del encéfalo a concentraciones de etanol tan altas como 160mM (Randoll et al 1996). Estudios realizados sobre la Fyn quinasa sugieren que la especificidad de determinadas áreas cerebrales podría en parte deberse a diferencias en la compartimentalización intracelular de las señales de las proteínas de transporte (Ron et al 2009).

Al parecer existen sitios de unión exactos del etanol dentro del residuo de metionina (Met818), leucina (Leu819) y un residuo similar de glicina y fenilalanina (Gly638, Phe369) en los dominios M3 y M4 de la subunidad NR1 del receptor NMDA, que controlan la aparente afinidad con las moléculas de etanol, mientras que la subunidad NR2A presenta específicos residuos Met823, Leu824 y Phe636, Phe637 y un fuerte sitio de unión al etanol en los dominios M3 y M4. En conjunto, los modelos estructurales predicen la presencia de cuatro sitios de unión al etanol en el receptor NMDA, cada uno conteniendo cuatro pares de posiciones en las subunidades NR1/NR2: Gly638/Met823, Phe639/Leu824, Met818/Phe636 y Leu819/Phe637 (Ronald et al 2001, Ren et al 2012).

La alteración que provoca el etanol en la expresión y funcionalidad de los receptores NMDA depende del periodo de exposición al tóxico. Lovinger y colaboradores (1989) publicaron que el etanol (5-100 mM) inhibía de forma aguda las corrientes iónicas activadas por los NMDA en cultivos de neuronas hipocampales de ratón. Esta inhibición también se detectaba en el resto de receptores glutamatérgicos, pero en menor intensidad que en los NMDA. El etanol inhibía el flujo de Ca^{2+} dependiente de los NMDA en estas

neuronas (Hoffman et al 1989, Wirkner et al 1999). El efecto inhibitor del etanol en la actividad del canal fue corroborada mediante la medición de los potenciales de corrientes excitatorias post-sinápticas mediadas por los NMDA en cortes de muchas regiones cerebrales como el hipocampo (Lima-Landman et al 1989, Lovinger et al 1990), cortex (Li et al 2002), amígdala (Calton et al 1999), núcleo accumbens (Nie et al 1994) y núcleo estriado (Wang et al 2007). La reducción en la actividad NMDA tras la exposición aguda al etanol es concentración-dependiente, y tiene un inicio muy rápido (menos de 100 mseg) (Criswell et al 2004). Estudios sobre cultivos de neuronas corticales han demostrado que el etanol disminuye la probabilidad de apertura del canal del receptor NMDA y el tiempo medio de apertura del mismo (Wright et al 1996).

En todo caso, la alteración que provoca el etanol en la expresión y funcionalidad de los receptores NMDA depende del periodo de exposición al tóxico. La exposición aguda *in vivo* inhibe la función del receptor NMDA, mientras que el tratamiento más allá de 24 horas *in vivo* e *in vitro* incrementa el número y funcionalidad del receptor (Kumari et al 2001), fenómeno conocido como “sobre-regulación” adaptativa de los receptores NMDA, y que se ha descrito en el cerebro de animales que han sido tratados de forma mantenida con alcohol (Tabakoff et al 1996). En ratones que han consumido etanol durante periodos entre cinco y once días se ha demostrado un incremento en el número de receptores NMDA en el hipocampo y otras zonas cerebrales conllevando un incremento de la actividad de dichos receptores desde 1 hora después de la retirada del etanol hasta como mínimo 7 horas después (Thomas et al 1998), y que dicho aumento en el número de receptores se relacionaba con la aparición de convulsiones por abstinencia alcohólica (Grant et al 1990, Gulya et al 1991, Snell et al 1993, Sanna et al 1993). Por otra parte, la administración de diferentes antagonistas NMDA se ha demostrado que puede prevenir los efectos bioquímicos y conductuales asociados al síndrome de abstinencia alcohólica, incluidas las convulsiones (Snell et al 2000). Una posible explicación de esta hiperexcitabilidad de los NMDA es el incremento reversible en el número de receptores como consecuencia de un mecanismo de adaptación a la inhibición de la actividad del canal.

En cultivos primarios de neuronas corticales, hipocámpales y granulosas cerebelosas, la exposición crónica al etanol (generalmente 50-100 mM de etanol entre 3 días y 1 semana) y la abstinencia siguiente han resultado en un incremento en la funcionalidad de los receptores NMDA, demostrado por el aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular y la formación de óxido nítrico estimulado por los NMDA, así como por el incremento del

binding de los NMDA (Iorio et al 1992, Hoffman et al 1995). Por otra parte, la exposición durante tres días de cultivos de neuronas corticales al tratamiento repetido con etanol (50-100 mM una vez al día) y la abstinencia posterior provocó al cabo de 24 horas de la retirada del alcohol un daño cuya extensión era proporcional a la concentración de etanol en el medio de cultivo. La liberación enzimática inducida por la abstinencia se redujo sensiblemente mediante la readición del alcohol, así como por la adición de un antagonista no competitivo (MK-801) o de un antagonista selectivo de la subunidad NR2B (treoifenprodil) (Nagy et al 2001). Estos datos sugieren que los receptores NMDA desempeñan un papel central en el desarrollo de la dependencia alcohólica y en la neurotoxicidad inducida por el etanol.

Sin embargo, cuando se evalúan los efectos del consumo de alcohol en la densidad del receptor NMDA maduro de animales durante periodos de tiempo mayores, los resultados son controvertidos. No se detectaron cambios con el uso del antagonista no competitivo MK801 ni con el antagonista competitivo CGP39653 tritados tras dos semanas de ingesta enólica. Sin embargo, usando los mismos ligandos, discretos pero significativos incrementos en la densidad NMDA en tejido hipocámpal y cortical de ratas se detectaron tras periodos de tres semanas de ingesta de otra dieta líquida alcohólica, aunque cuando esta misma dieta se alargó hasta seis semanas desaparecieron las diferencias hasta niveles no significativos (Rudolph et al 1997). Tras 28 semanas de exposición, un grupo de autores no detectó diferencias en la densidad de NMDA, medida mediante MK801 (Tremwell et al 1994).

Estos resultados negativos se obtuvieron en el estudio del receptor maduro NMDA. En cambio, al estudiar el efecto crónico sobre diferentes subunidades del receptor NMDA sí se detectaron cambios significativos. La abstinencia tras la exposición al vapor de etanol durante días-semanas incrementaba el número de subunidades NR1, NR2A y NR2B de los receptores NMDA en diversos estudios (Follesa et al 1996, Kumari et al 2001, Roberto et al 2004, Nagy et al 2003 y 2004a,b,c), aunque los cambios eran reversibles, y tras una semana de abstinencia mantenida ya no se observó tal cambio (Roberto et al 2006). Por otra parte, las neuronas que poseen una óxidonitrosintasa específica (enzima responsable de la síntesis de NO, neurotransmisor regulado por los receptores NMDA, y cuya estimulación se relaciona con las lesiones por excitotoxicidad) poseen una proporción mayor de NR1-4 y menor de NR1-1 y NR1-3 que las neuronas que no poseen dicha enzima (Weiss et al 1998). Dado que las variantes NR1-4 son las que más intensamente son inhibidas por el alcohol, tal observación sugiere que el sistema de señales mediado por el

NO puede verse alterado tras la ingesta de alcohol. La excesiva estimulación de la liberación de NO podría, por tanto, ser uno de los mecanismos lesivos del alcohol al ser ingerido regularmente. En conjunto, todos estos estudios confirman la hipótesis de que la hiperexcitabilidad del canal NMDA tras la exposición crónica al etanol y su abstinencia debe relacionarse al incremento en el ARNm y en los niveles de subunidades NMDA (Ron et al 2009). Así la máxima inhibición se ha detectado con las NR1-2B/NR2C, y las mínimas en las NR1-3B/NR2C, NR-3B/NR2D y NR1-4B/NR2C (Chandrasekar 2013). La detección de diferencias regionales en el cerebro en cuanto a la sensibilidad de los receptores NMDA al etanol ha motivado a diferentes grupos de investigadores a estudiar la relación entre la composición molecular de las subunidades de los receptores NMDA y la sensibilidad de las diferentes combinaciones de dichas subunidades al etanol.

Subunidades NR1

Como ya se ha comentado, la subunidad NR1 tiene 8 isoformas generadas por la expresión alternativa de un único gen, a través de tres sitios de conformación alternativa, una en el N-terminal y dos en el C-terminal. El extremo C-terminal de la subunidad NR1 está compuesto por cuatro fragmentos (C0, C1, C2 y C2'). El C0 está presente en todas las variantes posibles, y es un importante mediador de las acciones inhibitoras del etanol en el canal, como demuestra que su delección implique una reducción de la potencia de la capacidad inhibitoria del etanol en la actividad del receptor NMDA (Koltchine et al 1993, Anders et al 2000). Sin embargo, esta delección C0 parece sólo afectar a las combinaciones NR1/NR2A, pero no a las NR1/NR2B o 2C (Mirshagi 1998). Además, la reducción de la sensibilidad al etanol se asoció a la pérdida de aminoácidos relacionados en la unión de la calmodulina y alfa-actinin-2 (una proteína asociada al citoesqueleto) a la subunidad NR1, que era necesaria para la inactivación calcio-dependiente. En todo caso, dado que el dominio C-terminal del receptor contiene los sitios de fosforilación, no está claro si las diferencias en la sensibilidad al etanol entre subunidades con diferentes C-terminales son debidas a la propia composición de la subunidad o bien a la presencia de dichos sitios de fosforilación, ya que la fosforilación del receptor NMDA incrementa la actividad del mismo en diversos medios de preparación.

En un reciente estudio de las 8 variantes de la subunidad, coexpresadas individualmente con cada subunidad NR2 en células de riñón embrionario humano, se comprobó que las 32 combinaciones de subunidades fueron inhibidas por el etanol, aunque la sensibilidad de cada una de ellas dependía de la subunidad NR1 específica expresada en el receptor. Las NR1-3 y NR1-4 fueron las más inhibidas por el etanol, lo que sugiere que

cambios regionales, tanto durante el desarrollo como compensatorios, de la expresión de subunidades NR1 puede afectar significativamente la capacidad inhibitoria del alcohol sobre los receptores NMDA (Jin et al 2006).

Un estudio aún más reciente, sobre el comportamiento de ratones heterocigóticos con delección de NR1 (y por tanto con una capacidad funcional de sus receptores NMDA disminuida), demostró que estos ratones tendían a consumir dosis significativamente mayores de alcohol, y que durante la abstinencia aguda padecieron menor intensidad de convulsiones. Se compararon los niveles de subunidades NR2A-NR2D fueron comparadas entre ratones NR1+/- y controles de todos los subtipos, mediante PCR cuantitativa, Western blot e inmunohistoquímica en hipocampo, neocortex, estriado y cerebelo. La subunidad NR2B exhibió diferencias en la expresión de ARN en el hipocampo y niveles proteicos en múltiples áreas cerebrales, tanto en controles como NR1+/- . Estos resultados apuntan a que las subunidades NR1 juegan un papel tanto en el consumo de alcohol y en la clínica de abstinencia posterior, y sugieren que cambios concomitantes en las subunidades NR2B contribuyen a dichos efectos (Du et al 2012).

Por otra parte, la sustitución mediante mutación de la fenilalanina por 9 diferentes aminoácidos en el dominio TM3 (concretamente en la posición 639, llamada TM3 F639) de la subunidad NR1, coexpresada con subunidades NR2A, disminuye la capacidad inhibitoria del etanol sobre el receptor NMDA, especialmente si el aminoácido sustitutor es la alanina o la serina. Más aún, estos cambios también modifican la correlación concentración-respuesta a la glicina. Mutaciones de la alanina en la posición 813 del dominio TM4 y 819 incrementaron la capacidad inhibitoria del etanol. La sustitución del triptófano en el TM4 de las subunidades NR1 (posiciones 820-822), que en las subunidades NR2A homólogas reducen la inhibición por el etanol, no afectó a la sensibilidad por el tóxico. Sin embargo, estas subunidades NR1 TM4 mutantes restauraron la inhibición por el etanol de las NR1 TM3 F639 (Smothers et al 2006). Otro estudio muy reciente mutando la alanina en el dominio TM3 de las NR1 demostró una respuesta inhibitoria menor al etanol que la obtenida con la misma mutación en las subunidades NR2A (Yu et al 2012). Estos resultados indican que la sensibilidad al etanol por los receptores NMDA puede estar regulada por sitios concretos dentro de los dominios TM3 y TM4 en la subunidad NR1.

En cuanto al dominio N-terminal extracelular de la subunidad NR1 y la afinidad de las subunidades resultantes a antagonistas NMDA como el etanol, aunque inicialmente algún estudio sugirió que algunas variantes de dicho dominio en las subunidades NR1 poseían mayor afinidad para dichos fármacos (Zukin et al 1995), posteriormente no se han

detectado diferencias significativas (Popp et al 1998, Smothers et al 2013), sugiriendo que dicho fragmento no es sitio primario de acción del etanol.

Efecto crónico del etanol en las subunidades NR1

El tratamiento crónico con etanol sobre-regula la inmunoreactividad de las subunidades NR1 en un 65% en el hipocampo de rata (Trevisan et al 1994). Posteriormente se demostró un incremento de la proteína NR2B en el prosencéfalo límbico (encéfalo anterior) de ratones tratados con una dieta líquida de alcohol durante cinco días. La prolongación de la ingesta de etanol durante 12 semanas aumentó la inmunoreactividad NR1, NR2A y NR2B en preparaciones de membranas crudas de hipocampo de rata y en el área ventral tegmental (Follesa et al 1995). Los mismos autores confirmaron (en neuronas fetales corticales de rata) el incremento de los polipéptidos NR1 y NR2B, que se acompañaba además de un aumento concomitante de los niveles de ARNm que codifica la subunidad NR2B (Hu et al 1996). Tras 48 horas de retirada del tóxico las subunidades NR1 retornaron a los niveles control (Follesa et al 1996).

Más recientemente otros estudios (Hoffman et al 2003) detectaron cambios en las variantes NR1 en ratas que consumieron etanol durante 8 días. Se ha descrito una disminución de las variantes NR1 que contienen el exon 5 (la llamada isoforma b) en neuronas corticales de ratas macho adultas tras 16 días de exposición al etanol (Hardy et al 1999).

Los resultados de los estudios sobre la relación entre etanol y las alteraciones en el ARNm responsable de la síntesis de las diferentes subunidades componentes de los receptores NMDA, con resultados dispares. Dos grupos diferentes (Snell et al 1996, Hu et al 1996) no detectaron incrementos del ARNm de las subunidades NR1 y NR2A en preparaciones de membranas crudas de hipocampo, córtex y cerebelo de ratones alcohol-dependientes. Tampoco se observaron diferencias en las variantes de ARNm en el hipocampo de ratas con preferencia por el alcohol (ratas AA, *alcohol-preferring*) tras una dieta líquida alcohólica durante un mes, aunque sí se objetivó un incremento de los niveles de variantes de las proteínas NR1 con los extremos C-terminal más cortos (NR1-3/NR1-4) (Winkler et al 1999). Sin embargo, al parecer el tratamiento crónico con etanol sí aumentó específicamente la vida media del ARNm correspondiente a las subunidades NR1 en neuronas fetales corticales (Kumari et al 1998). El ARNm correspondiente a la subunidad NR2B también se demostró aumentado en el córtex de ratas con dependencia física al etanol tras su exposición al vapor de etanol (Hardy et al 1999). En un artículo publicado más recientemente los autores detectaron que el tratamiento de ratas con etanol durante

seis días sí resultó en incrementos de los niveles de ARNm de las subunidades NR2A y NR2B en hipocampo y córtex (Devaud et al 2004).

Sin embargo, también se han publicado estudios que han detectado disminuciones en los niveles de ARNm correspondientes a las subunidades NR1-2 y NR1-4, tras administrar durante 8 días alcohol a ratas macho adultas (Darstein et al 2000). Otros investigadores detectaron, en neuronas corticales de rata, una disminución del ARNm y de los niveles de proteínas de determinadas variantes NR1, aunque paradójicamente un incremento de los niveles de las variantes concretas de subunidades NR1-4 (Nagy et al 2003). Por su parte, Hoffman y colaboradores observaron, en ratas bajo el consumo de etanol por gavaje durante 8 días, una disminución en el ARNm en algunas áreas cerebrales para dos variantes NR1, las subunidades NR1-2 y NR1-4, ambas con deleciones en las regiones C-terminales (Hoffman et al 2003).

Otros autores estudiaron la distribución de todas las variantes NR1, mediante técnicas de transcripción inversa-PCR y Western blott, en cultivos de células neuronales corticales de fetos de ratones expuestos durante cinco días al etanol (50 mM), concluyendo que el tratamiento crónico con etanol disminuía selectivamente el ARNm y los niveles de polipéptidos correspondientes a la isoforma NR1-4b, incrementando paralelamente la proporción de polipéptidos NR1-4a, aunque sin efectos sobre el ARNm que codifica esta última isoforma (Kumari et al 2001). Estos datos apoyaban claramente la hipótesis de los efectos selectivos del tratamiento crónico con etanol sobre la expresión de determinadas variantes NR1, tanto a nivel del ARNm como de los niveles polipeptídicos, y permitían explicar la aparente falta de resultados obtenidos por otros autores al medir ARNm globales para las NR1 tras el tratamiento crónico con alcohol (Hu et al 1996).

Subunidades NR2

Existen diversos estudios que demuestran que los receptores NMDA que contienen subunidades NR2C (limitadas al cerebelo) o NR2D (localizadas en el tronco del encéfalo) son menos sensibles a los efectos inhibitorios del etanol, comparados con los que contienen subunidades NR2A (las subunidades más frecuentemente expresadas en el cerebro adulto), y las NR2B (que son más prominentes durante los periodos prenatal y postnatal temprano) (Kuner et al 1993, Blevins et al 1997, Fink et al 1996, Allgaier 2002). No está claro si las NR2A son más sensibles que las NR2B al etanol (Mirshahi et al 1995, Blevins et al 1997).

La estrecha relación entre el incremento de las subunidades NR2B y la sobre-regulación adaptativa al alcohol se observa en otro estudio, en el que los autores estudian la

relación de dichas subunidades con el factor activador del plasminógeno tisular (tPA). Dicho factor es una proteasa, implicada en la plasticidad neuronal y las convulsiones, y cuya actividad es inducida de forma temporal en el sistema límbico por el alcohol consumido de forma crónica. El tPA interacciona con los receptores NMDA que poseen subunidades NR2B, y es un factor necesario para la sobre-regulación de dichas subunidades ante el alcohol. En consecuencia, ratones con déficit de tPA poseen una reducida capacidad de fosforilación por las quinasas extracelulares y de sufrir la sobre-regulación adaptativa al etanol de las subunidades NR2B, por lo que tampoco poseen capacidad de padecer convulsiones durante la abstinencia alcohólica. Más aún, la facilitación de las convulsiones por abstinencia mediada por el tPA es abolida mediante el ifenprodil, antagonista específico de los NR2B (Pawlak et al 2005). En todo caso, la presencia de NR2B es un factor, aunque no el único, que contribuye a la alta sensibilidad al etanol de los receptores NMDA (Yang et al 1996, Popp et al 1999).

Aunque existen estudios que no detectaron diferencias detectables sobre algunas subunidades NMDA atendiendo al género del animal, subunidad de receptor estudiada y regiones cerebrales analizadas (Devaud et al 2004), otros grupos mediante Western blot detectaron un incremento del nivel de subunidades NR2A y NR2B en cortes de hipocampo de ratas alcoholizadas durante 14 días, y sometidas a una abstinencia posterior de 7 días, (Nelson et al 2005).

Es importante destacar que diferentes variantes de subunidades NR1 pueden afectar la sensibilidad de las NR2 al etanol; la máxima inhibición de la actividad del canal se observa en la combinación NR1-2b/NR2C, y la mínima en NR1-3b/NR2C, NR1-3b/NR2D, y NR1-4b/NR2C (Jin et al 2006).

Por último, algunos aminoácidos en el tercer y cuarto dominio transmembrana de las NR2A han sido identificados como residuos que contribuyen a las acciones inhibitorias del etanol sobre la actividad del canal (Ren 2007, Honse 2004).

Cofactores

Otros factores que han sido considerados como moduladores de la sensibilidad al etanol de los receptores NMDA incluyen el Mg^{2+} y agentes redox (Michaelis et al 1994, Chu et al 1995). En general, no existen evidencias de peso a favor de estos factores en relación a la sensibilidad al etanol.

GMP cíclico

Una de las primeras líneas de laboratorio desarrolladas (Tabakoff et al 1996) por algunos investigadores fue la dedicada al estudio de los mecanismos mediante los cuales el etanol reduce los niveles de GMP cíclico en el cerebelo. En cultivos de neuronas granulosas cerebelosas, el etanol, a concentraciones de 10-50 mM, redujo la producción de GMP cíclico estimulado por el glutamato.

La glicina endógena

Como se ha descrito en capítulos anteriores, la glicina posee un sitio de unión en la superficie externa del receptor NMDA. La estimulación por la glicina al parecer es un requerimiento imprescindible para la activación del receptor, por lo que se considera a este aminoácido como un coagonista del glutamato (Monaghan et al 1989). En presencia de una concentración constante de glicina, la inhibición enólica no puede ser revertida por incrementos de la concentración del neurotransmisor NMDA, de lo que se deduce que las respuestas inducidas por el tóxico en dichos receptores actúan con un mecanismo no competitivo (Hoffman et al 1989, Wright et al 1996).

En contraste, la inhibición de los NMDA provocada por el alcohol en cultivos de células granulosas cerebelosas sí puede ser revertida por altas concentraciones de la glicina (Rabe et al 1990), lo que sugiere que el etanol es capaz de disminuir la potencia de unión de la glicina en el receptor NMDA (Snell et al 2000). En presencia de una concentración constante de neurotransmisor, la inhibición por el alcohol del receptor será mayor ante bajas concentraciones de glicina, y disminuirá a medida que la glicina incrementa su concentración. Altas concentraciones de glicina pudieron incluso revertir el efecto inhibitorio del etanol en los receptores NMDA en células de núcleo estriado, y revertían también paralelamente los incrementos estimulados por el NMDA del Ca^{2+} intracelular en células disociadas de cerebro neonatal (Dildy et al 1989), aunque dicha capacidad de reversión pueda darse tan sólo en unas determinadas condiciones de cultivo, y en un entorno intracelular muy estable (Popp et al 1999).

A la controversia sobre el tema se añaden algunos estudios con resultados opuestos o negativos, aunque podrían deberse a las condiciones experimentales (Cebers et al 1996, Popp et al 1999). Tampoco la glicina revirtió la inhibición enólica sobre los NMDA en cortes corticales e hipocampales (Gonzales et al 1990), no afectó a la inhibición por el tóxico de las corrientes NMDA en cultivos de neuronas hipocampales, ni influyó en la inhibición enólica de los incrementos de Ca^{2+} intracelular mediados por los receptores NMDA en cultivos de neuronas corticales (Randoll et al 1996). Es posible que la aparente

disparidad en los resultados de estos estudios guarde relación con el área cerebral estudiada en cada uno de los trabajos, siendo las neuronas corticales e hipocampales insensibles a la reversión del efecto inhibitorio del etanol por la glicina, al contrario que las granulosas cerebelosas y del núcleo estriado, y que estas diferencias estén asociadas a la distinta composición de las subunidades receptoras entre áreas cerebrales (Buller et al 1995).

Las quinasas intracelulares

Estudios de subunidades NR1 expresadas en células de mamíferos revelaron un incremento calcio-dependiente de la sensibilidad de los receptores a la inhibición alcohólica, que pudo eliminarse cuando el dominio C-terminal de las NR1 fue modificado. Dado que el dominio C-terminal del receptor contiene los sitios de fosforilación, este estudio refuerza la hipótesis de que las quinasas calcio-dependientes y las fosfatasa influyen la acción del etanol. Si la activación de la PKC resulta en un incremento de la fosforilación y activación de los receptores NMDA, la inhibición alcohólica de la funcionalidad de los receptores NMDA hipocampales podría estar mediada por la defosforilación de dichos receptores, activada por el etanol mediante el incremento de la actividad de una tirosinafosfatasa (Alvestad et al 2002). Como respuesta rápida a dicha inhibición alcohólica, podría producirse una reacción compensatoria de incremento de la fosforilación del receptor, que conduciría a la aparición de una tolerancia aguda a los efectos del etanol en la función del receptor (Miyakawa et al 1997, Poelchen et al 2001).

Según esta hipótesis podría esperarse que la fosforilación del receptor hipocampal pudiera contrarrestar el efecto del etanol. Un estudio en cerebros de ratones demostró que las tirosinquinasa como la Fyn pueden fosforilar residuos de tirosina en los NR2A y NR2B. La fosforilación del receptor NMDA por la tirosinquinasa Fyn conlleva la resistencia a la inhibición por el alcohol de la función de los NMDA (Miyakawa et al 1997). Otro efecto derivado de la adición de tirosinquinasa Fyn a las neuronas fue la reducción de la inhibición por el etanol de los receptores recombinantes que contienen subunidades NR2A de células mamíferas (Anders et al 1999).

Un estudio histoquímico sobre motoneuronas en cortes de médula espinal de ratones neonatos, que contienen en el núcleo PKC-gamma en abundancia, aportó más datos a favor de la relación entre PKC y tolerancia y abstinencia alcohólicas. El efecto depresivo del etanol y las respuestas de hiperactivación durante la abstinencia se midieron a través de los incrementos del Ca^{2+} intracelular, observándose que la exposición de dichas células al etanol indujo a la traslocación del enzima desde el núcleo hasta el citoplasma. Además, el pre-tratamiento con un inhibidor específico de la quinasa, llamado gammaV5-3,

bloqueó la traslocación inducida por el etanol y también las sobrerrespuestas de la abstinencia enólica (Li et al 2005). Sin embargo, este mecanismo de acción no ha podido demostrarse en otras áreas cerebrales. Incluso algunos autores han sugerido un efecto inhibitorio del enzima sobre la funcionalidad de los receptores NMDA (Snell et al 2000).

Cambios en la localización de los receptores ante el estímulo alcohólico

La regulación dinámica de la eficacia sináptica depende del flujo de los receptores NMDA hacia las sinapsis y sus desplazamientos, incluyendo la inserción y desinserción de los receptores de la membrana sináptica plasmática (Carroll et al 2002). Se ha demostrado que un número importante de subunidades NR1 se localiza intracelularmente, mientras que las subunidades NR2 se expresan primariamente en la superficie celular de las neuronas, y que las subunidades NR1 requieren la co-expresión de las NR2 para desplazarse eficientemente dentro de la superficie celular. Además, los receptores NMDA pueden localizarse tanto sináptica como extrasinápticamente. Una vez los receptores se han insertado en la membrana plasmática neuronal pueden difundir libremente hasta quedar atrapados y estabilizarse en localizaciones sinápticas, a través de su asociación a complejos proteínicos que los anclan al citoesqueleto postsináptico (Turrigiano et al 2000).

El tratamiento crónico de neuronas hipocampales con antagonistas de receptores NMDA induce no sólo a un incremento del grupo de receptores NMDA que contienen subunidades NR1, sino también a un cambio en la localización de este grupo de receptores en las sinapsis (Rao et al 1997), alterando la relación existente entre la localización extrasináptica y la sináptica (Hoffman 2003). En un experimento sobre membranas sinápticas hipocampales de ratones que habían consumido alcohol crónicamente, en el momento de la abstinencia alcohólica se detectó un incremento en el nivel de las subunidades NR1, NR2A y NR2B, tanto en el homogeneizado total como en las fracciones de membranas. A las 6 horas de la abstinencia, cuando los signos clínicos de la abstinencia arreciaban y las crisis convulsivas son de mayor severidad, hubo un fuerte incremento en el nivel de subunidades en las fracciones de membrana sináptica, mientras que las proteínas del homogeneizado retornaban a los niveles control (Nunley et al 2001). Por otra parte, otros estudios han evidenciado que una semana de exposición de las neuronas al etanol incrementa las agrupaciones (*clusters*) dendríticas de NR1 y NR2A, e incrementa también la fracción de NR1 asociadas a NR2A, y la fracción de NR2A asociadas con las NR1. Estos cambios son compatibles con mayores movimientos de NR1 en la superficie celular (y posiblemente también en localización sináptica), en las células tratadas con alcohol (Carpenter-Hyland et al 2001, Hoffman et al 2003).

Efectos del etanol sobre los factores transcripcionales

Recientemente se ha sugerido que el alcoholismo y las enfermedades relacionadas con el alcohol son el resultado de una compleja interacción de factores genéticos múltiples y ambientales. Diversos estudios han puesto de manifiesto que determinados polimorfismos de los genes responsables de la síntesis de las subunidades NR1 y NR2 de los receptores NMDA se asocian a una mayor vulnerabilidad al alcohol, mayor tendencia al padecimiento de delirium tremens y convulsiones durante la abstinencia alcohólica, y a un inicio precoz en el abuso del mismo (Wernicke et al 2003). En consecuencia, existiría por una parte una predisposición genética al alcoholismo, y a su vez el consumo de alcohol induciría modificaciones en la lectura genética que contribuiría a la patología relacionada con el tóxico.

Estas interacciones dinámicas y a múltiples niveles son responsables de la heterogeneidad y complejidad de las patologías asociadas al alcoholismo (Brooks et al 2000, Starkman et al 2012). Diversos estudios con micromatrices de ADN (*microarrays*) apoyan que el etanol podría influir en diferentes momentos del circuito genético. Un estudio sobre la expresión de aproximadamente 10000 genes en el cortex frontal y motor de humanos alcohólicos crónicos, comparados con controles no consumidores, detectó una reprogramación selectiva de la expresión genética en distintos grupos funcionales de genes. Las diferencias más marcadas se detectaron en los genes relacionados con la mielina y con diversas proteínas de transporte neuronal, así como en las vías de señalización del AMPc, calcio y tiroideas, sugiriendo que la neuropatología y las alteraciones neuronales observadas en el alcoholismo afectan a múltiples vías genéticas (Mayfield et al 2002). Posteriormente otros investigadores compararon la expresión del ARN en el núcleo accumbens y el cortex prefrontal de muestras cerebrales provenientes de alcohólicos, detectando que aproximadamente el 6% de los genes sensibles al alcohol eran comunes en las dos áreas. En el cortex frontal, los genes predominantes eran los que codifican proteínas de transporte del ADN incluyendo factores de transcripción y proteínas de reparación. Los genes encargados de la codificación de proteínas mitocondriales estaban infra-regulados, lo cual resultaba en una disrupción de la función mitocondrial y la producción de energía, aumentando el estrés oxidativo. Otros genes alcohol-sensibles en el cortex se relacionaron con la apoptosis y la neuroprotección. En contraste, en el núcleo accumbens los genes relacionados con el alcohol se asociaron a la regulación de la arquitectura celular y transmisión de señales en la sinapsis, sugiriendo una neuroadaptación a la exposición crónica al alcohol en la estructura y función sinápticas (Flatscher-Bader et al 2005).

Procesos epigenéticos

A los procesos químicos que modifican la actividad del ADN pero sin alterar su secuencia los denominamos epigenéticos. Tres de los mecanismos más importantes de la regulación epigenética, en los que el etanol podría ejercer parte de sus efectos, son:

1. La metilación del ADN (Qiang et al 2010), ya que la hipometilación provocada por el tóxico puede conducir a una alteración en la expresión génica y de la estructura cromatínica que conduce a alteraciones del DNA y a la rotura de las cadenas que lo conforman (Pignataro et al 2009), lo que podría finalmente conducir a la disfunción tisular y a la patología (Hillemarcher 2011). Un muy reciente estudio publicado ha detectado consistentes disminuciones de la metilación del ADN con importantes repercusiones en la transcripción genética (Ponomarev et al 2012).
2. La acetilación de histonas. El etanol causa la acetilación selectiva de determinadas histonas e incrementa la actividad de la histona-acetil-transferasa (Park et al 2005). En presencia de grupos hiperacetilados la cromatina nuclear se relaja y se hace accesible a las proteínas transcripcionales, resultando en un incremento de la transcripción (Ponomarev et al 2012).
3. La fosforilación de histonas, crucial para las modificaciones de la cromatina nuclear, que activan la transcripción génica (Aroor et al 2010).

Etanol y ARNm

Tras apenas unas horas de contacto con el etanol en el medio se produce un enorme incremento en el glutamato liberado, y los niveles polipeptídicos de las subunidades NR1 y NR2B aumentan en número, aunque disminuye su sensibilidad al tóxico, situación que se mantiene a lo largo del tiempo, en el estado de alcoholización crónica (Kumari et al 2005). Más recientemente se han intentado identificar los mecanismos moleculares que subyacen bajo el incremento de las subunidades NR1, y se ha detectado un incremento de la estabilidad del ARNm de las NR1 durante la exposición crónica al etanol, posiblemente a través de la asociación con diversas proteínas de enlace del ARN (Anji et al 2011).

La expresión génica de las diferentes proteínas, como son las subunidades del receptor NMDA, está regulada, además de por la transcripción del ARNm correspondiente, por las alternativas expresadas del precursor del ARNm (pre-ARNm). El pre-ARNm transcrito contiene secuencias llamadas intrones, que deben ser escindidas antes del transporte de la molécula al citoplasma para su traducción. La eliminación o empalme de los fragmentos (*splicing*) puede alterar las propiedades del receptor glutamatérgico, puesto

que algunos exones (partes no excedentes del ARNm) se encuentran en el extremo de la molécula, y pueden ser o no escindidos. Es el caso de las ocho variantes de subunidades NR1 derivadas del *splicing* de los exones 5, 21 y 22, que determinan los extremos N y C (Bradley et al 2006). Las diferentes variantes exhiben afinidades diferentes a agonistas y antagonistas, la modulación por el zinc, y un patrón de expresión regional y de desarrollo diferentes. Además, el *splicing* puede afectar el traslado intracelular, la colocación y el anclaje de los complejos receptores. Cuando las ocho isoformas de la subunidad NR1, cuyo mensaje genético está contenido en un solo gen, son co-expresadas en diversas combinaciones con una de los cuatro subtipos de NR2, la inhibición máxima de la actividad del canal en presencia de etanol se detecta en NR1-2b/NR2C, mientras que la mínima fue detectada en NR1-3b/NR2C, NR1-3b/NR2D, y NR1-4b/NR2C (Acosta et al 2010). En cuanto a las variantes de las subunidades NR2, en relación a diferentes exones alternativos, la escisión del exón 2 en la variante NR2B se ha relacionado con el efecto regulador del etanol sobre dicha isoforma (Mei et al 2005). Puede sugerirse que los polimorfismos en múltiples genes sensibles al efecto del etanol probablemente incrementan el riesgo de alcoholismo mediante la modulación de la expresión de determinadas variantes o isoformas. Aún no está claro cómo el etanol afecta el mecanismo del *splicing* y a los polimorfismos asociados al alcoholismo, aunque el estrés oxidativo inducido por el metabolismo del etanol puede ser un factor (Chandrasekar 2013).

Muerte celular y etanol

Finalmente y más allá de los cambios funcionales, los mecanismos mediante los cuales el etanol induce la muerte celular son muy complejos y están interrelacionados. Actualmente se hipotetiza que la relación entre la muerte celular y el etanol incluye directamente al sistema glutamatérgico, a través de diferentes mecanismos: la propia inhibición de los receptores NMDA, de la que ya hemos hablado en los capítulos precedentes; la interferencia en las señales de diversos factores neurotróficos como el extremo C-terminal del receptor NMDA, relacionado con sitios de fosforilación de quinasas y proteínas de unión al citoesqueleto (Tingley et al 1997, Ehlers et al 1995); la inducción del estrés oxidativo en el tejido nervioso, a través fundamentalmente de la producción de acetaldehído por la alcohol-deshidrogenasa citosólica (Flora et al 2012); la modulación de las señales del ácido retinoico, la alteración de las corrientes de los canales de potasio, la deficiencia de tiamina y la interferencia en la regulación translacional (Chandrasekar 2013).

Conclusiones

Probablemente la sensibilidad de un grupo neuronal al etanol no sea fruto de un único factor, sino a la combinación de varios de ellos, actuando a diferentes niveles celulares y moleculares. En la actualidad los datos más concluyentes apuntan a que la regulación de la sensibilidad de la región extracelular del receptor NMDA al alcohol se realiza a través de procesos de fosforilación y defosforilación, tanto en las subunidades de los receptores, como en proteínas accesorias.

Por otra parte, los diferentes tipos de neuronas, ubicadas en las distintas áreas cerebrales, podrían contribuir a determinar el que en un determinado grupo de receptores predominen determinadas subunidades del receptor NMDA, más o menos sensibles según su composición a los efectos del etanol.

A su vez, el propio etanol podría actuar como modulador de la sensibilidad de un determinado grupo de receptores, a través de modificaciones en la composición de las propias subunidades, o en la ubicación de los enzimas de fosforilación/defosforilación dentro de la estructura celular.

IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA MODULACIÓN DE LOS RECEPTORES NMDA POR EL ETANOL

Inhibición aguda

El receptor NMDA posee una función clave en la potenciación a largo plazo (PLP) de la respuesta sináptica mediada por los AMPA (ver capítulos anteriores). En consecuencia, la inhibición provocada en los NMDA por el etanol provoca un bloqueo hipocampal en la PLP (Givens et al 1995, Schummers et al 2001), más pronunciado en ratas jóvenes de 30 días que en adultos (90 días) (Pyapali et al 1999). La PLP es un modelo de aprendizaje y memoria, y en humanos el etanol interrumpe la secuencia de una gran variedad de tareas en las que está implicada la memoria a corto plazo (Acheson et al 1998), y podía provocar, a través de la inhibición de la PLP, las lagunas de memoria alcohólicas (Tsai et al 1998). Además, la inhibición de la PLP en el hipocampo puede ser responsable de los episodios de amnesia post-ingesta enólica (White et al 2000).

Tolerancia aguda

El efecto inicial del etanol sobre la actividad NMDA es la inhibición. Sin embargo, en algunas regiones cerebrales el efecto inhibitorio se reduce en función del tiempo de contacto del fármaco con el receptor. Esta disminución aguda de la sensibilidad de los NMDA a la inhibición enólica es llamada “tolerancia aguda” y fue inicialmente descrita en cortes hipocampales de rata, en los cuales se observó una clara disminución de la inhibición alcohólica tras un periodo de exposición al tóxico de 15 minutos (Grover et al 1994), confirmándose posteriormente que se eliminaba el efecto inhibitorio del etanol sobre la PLP mediada por los NMDA (Tokuda et al 2007). En cortes de médula espinal la actividad depresiva sobre los NMDA del etanol disminuía un 37% a los 8-10 minutos, pero tan sólo un 17% a los 20 minutos, y en neuronas de otras zonas cerebrales como el locus ceruleus o la amígdala también mostraron fenotipos similares de tolerancia aguda (Poelchen et al 1997).

Se han detectado hasta el momento seis genes asociados a la tolerancia aguda alcohólica en roedores (Kirstein et al 2002). Dichos genes incluyen la subunidad NR1 del receptor NMDA, un sistema tirosinquinasa que puede fosforilar las subunidades del receptor NMDA, proteínas estructurales, y proteínas relacionadas con la propagación de las señales de los receptores NMDA (Tabakoff et al 2003). Como ya se ha comentado, las subunidades NR2 son fosforiladas por una familia de proteintirosinquinasa, Fyn y Src, tras cuya activación se produce una sobre-regulación de la función del canal (Salter et al 2004). Experimentos previos habían objetivado que la fosforilación de las subunidades NR2B se incrementa tras la administración de etanol en ratones heterocigotos Fyn, pero no en los ratones con delección Fyn, y que la tolerancia aguda a la inhibición alcohólica de las corrientes mediadas por los NMDA no se observa en los que poseen dicha delección Fyn, sugiriendo que la Fyn quinasa está implicada en el fenómeno de la tolerancia aguda de los receptores NMDA al etanol. Es posible que la tolerancia aguda a los efectos del alcohol en los receptores NMDA dependa de la capacidad de fosforilación del receptor o de proteínas accesorias, la cual conduce a una menor capacidad de inhibición de la funcionalidad del receptor por parte del etanol (Miyakawa et al 1997).

Una cuestión interesante es si la tolerancia implica también una disminución del tiempo de inhibición provocado por el etanol, y no tan sólo la disminución en su intensidad inhibitoria. Algunos estudios sugieren que sí, en hipocampo (la actividad retornó a niveles basales tras 35 minutos de la exposición al alcohol) y en médula (40 minutos) (Lai et al 2004).

La capacidad de mantener la PLP durante la tolerancia alcohólica sugiere que la formación de la memoria y la plasticidad sináptica pueden desarrollarse en respuesta a la exposición al alcohol. Esto permite especular que la sobre-regulación adaptativa de los receptores NMDA al etanol observada in vivo puede contribuir a los trastornos en la memoria y aprendizaje que padecen los consumidores habituales, así como a la génesis del hábito asociado con la adicción al alcohol (Dickinson et al 2002, Everitt et al 2005).

Un estudio realizado sobre voluntarios no consumidores de alcohol pero con historia familiar de alcoholismo, a los que se administró otro antagonista de los receptores NMDA, la ketamina, puso de manifiesto que aquellos con antecedentes familiares de alcoholismo padecían menos efectos clínicos (disforia...) que los voluntarios sin carga familiar, sugiriendo que efectivamente hay un contexto genético que predispone a la mayor tolerancia a los efectos agudos del alcohol y, por tanto, a un mayor consumo del tóxico (Petrakis et al 2004).

Exposición crónica al etanol y abstinencia

La abstinencia que ocurre tras la ingesta repetida de etanol está mediada por la actividad excesiva de los receptores NMDA de las neuronas hipocampales, tanto en cultivos (Carpenter-Hyland et al 2004) como en cortes (Hendrickson et al 2007). Este efecto es abolido por antagonistas de estos receptores. La actividad excesiva de los NMDA, asociada a la abstinencia (retirada brusca del tóxico) y al incremento del flujo de Ca²⁺ por el cnaal, sería la causa fundamental de la neurotoxicidad y muerte celular (Fadda et al 1998) que se detectan mayoritariamente en las neuronas glutamatérgicas con receptores NMDA en las células corticales piramidales, células piramidales hipocampales de CA1, células granulares en el *girus dentatus* y en la amígdala (Lovinger 1993, Obernier et al 2002).

La neurotoxicidad mediada por los NMDA y la muerte celular resultante de la abstinencia alcohólica puede ocasionar la disminución de neuronas en el cortex (Harper et al 1987) y el cerebelo (Baker 1999), y una disminución en el número de dendritas en neuronas corticales (Harper et al 1990). La hiperactivación de los receptores NMDA podría ser la causa de las convulsiones y otros síntomas observados en roedores y humanos durante la abstinencia alcohólica, potencialmente fatales (Hall et al 1997).

LOS RECEPTORES NMDA Y LOS CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO PROVOCADOS POR EL ALCOHOL

Desde hace años se conoce que el etanol altera la neurotransmisión glutamatérgica en animales de laboratorio, a través de la inhibición de la respuesta de los diferentes receptores glutamatérgicos, y en especial de los NMDA.

En la tabla 3 se enumeran las principales formas clínicas de presentación de la enfermedad alcohólica, y su posible relación etiopatogénica con el sistema glutamatérgico.

<u>Presentación clínica</u>	<u>Efectos glutamatérgicos del etanol</u>
Intoxicación alcohólica aguda; alteraciones cognitivas asociadas Euforia y dependencia	Atenuación aguda de la neurotransmisión de los receptores NMDA Incremento de la neurotransmisión dopaminérgica. Sobre-regulación de los receptores glutamatérgicos
Pérdidas de memoria (blackout)	Alteración de la potenciación a largo plazo; atenuación aguda de la neurotransmisión de los receptores NMDA en el contexto de la sobre-regulación adaptativa crónica de dichos receptores
Síndrome de Wernicke-Korsakoff Degeneración cerebelosa. Atrofia cerebral	Supersensibilidad de los receptores NMDA que conduce a la excitotoxicidad. Disminución de magnesio, zinc y tiamina. Incremento del óxido nítrico, hipercortisolemia.
Síndrome alcohólico fetal	Bloqueo de los efectos tróficos de los receptores NDMA. Disminución de la densidad de receptores glutamatérgicos postnatales.

Tabla 3. Hipótesis glutamatérgica de la lesiones cerebrales por ingesta de alcohol (adaptado de Tsai et al, 1998)

INTOXICACIÓN ALCOHÓLICA AGUDA

Tras la ingesta de una sola dosis de etanol el animal de laboratorio ya sufre una atenuación aguda y transitoria de la neurotransmisión mediada por los receptores NMDA (Lovinger et al 1989, Hoffman et al 1989).

Según esta misma hipótesis glutamatérgica, las pérdidas de memoria (*blackout*) que padecen frecuentemente los consumidores habituales de dosis importantes de alcohol tras una ingesta copiosa del mismo, podrían relacionarse con la brusca inhibición provocada por el etanol de la neurotransmisión glutamatérgica, cuando de base ya existe una sobre-regulación adaptativa de los receptores glutamatérgicos.

LOS NMDA Y EL ALCOHOL COMO ESTÍMULO REFORZANTE

El alcohol como estímulo reforzante positivo

Un estímulo reforzante (*reinforcer*) es un evento cuya presencia, en el contexto de una respuesta de comportamiento, modifica la probabilidad de que dicha respuesta ocurra en el futuro. Un estímulo reforzante puede ser positivo, cuando su presencia resulta en un incremento de la probabilidad futura de la respuesta, o bien negativo, cuando al eliminarlo se incrementan las posibilidades de que reaparezca en el futuro la respuesta de comportamiento. Las vías mesolímbicas dopaminérgicas están íntimamente envueltas en las respuestas de refuerzo (“*reinforcement*”) (Hitchcott et al 1997). Se cree que el refuerzo positivo asociado a las drogas está mediado por la activación de dichas vías, así como por otros sistemas neurotransmisores de la amígdala, que incluyen la corteza del núcleo accumbens, la amígdala central medial, el núcleo de la *stria terminalis* y la sustancia innominada sublenticular.

Las interacciones de los sistemas glutamatérgico y dopaminérgico en el sistema mesolímbico son muy complejas (Kitai et al 1999). Algunos estudios sugieren que el receptor NMDA está relacionado con los efectos de refuerzo positivo del alcohol, determinando así el impulso de mantener el consumo de dicho tóxico. Tanto la administración de etanol como de otros antagonistas de los receptores NMDA, incrementan la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Imperato et al 1986). Además, la administración de diferentes antagonistas NMDA por vía sistémica o directamente en el núcleo accumbens de ratas redujo de forma significativa la respuesta operativa producida por el alcohol, disminuyendo su consumo (Bienkowski et al 1996, Stromberg et al 1999). Sin embargo, sólo algunos antagonistas del receptor NMDA como la dizocilpina o MK-801 estimulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental (Diana et al 1993), sugiriendo la existencia de diferentes mecanismos de control en la liberación dopaminérgica en dicho territorio, además del NMDA.

Efectos ansiolíticos del alcohol como estímulo reforzante

Dentro de la amígdala, determinados sistemas neurotransmisores son importantes para las respuestas mediadas ante los agentes estresantes, y entre ellos están los receptores glutamatérgicos. Las neuronas de la amígdala basolateral poseen receptores NMDA y AMPA, y los tratamientos que disminuyen la transmisión mediada por dichas neuronas provocan efectos ansiolíticos (Davis et al 1994). Los receptores NMDA en la amígdala podrían ser especialmente importantes en la patología de la ansiedad, dado que existen fuertes evidencias que relacionan las conexiones neuronales amigdalares como mediadoras del miedo y la ansiedad. El efecto ansiolítico de dosis bajas de etanol y de otros antagonistas NMDA, que podría ejercerse a través de su influencia sobre la amígdala, es bien conocido tanto en animales como en humanos (Eckardt et al 1998, Merikangas et al 1998) y debe considerarse un efecto reforzante, puesto que incrementa la tendencia al consumo de etanol. La expresión del ARNm que codifica las NR1 aumenta selectivamente en animales crónicamente expuestos al etanol en la amígdala lateral y basolateral de rata, sugiriendo la importancia del efecto adaptativo del alcohol sobre los receptores NMDA en la amígdala (Floyd et al 2003). Por otra parte, el tratamiento crónico con etanol conlleva neuroadaptaciones en el sistema NMDA del núcleo central de la amígdala, tanto a nivel de la transmisión glutamatérgica presináptica como postsináptica (Roberto et al 2004).

LOS RECEPTORES NMDA EN LA ADAPTACIÓN CRÓNICA AL ETANOL. TOLERANCIA Y DEPENDENCIA.

Tolerancia aguda al alcohol

De forma general, se define la tolerancia como la capacidad de soportar o de dar una respuesta menor frente a un estímulo, generalmente tras un período de exposición continuada a dicho estímulo. La tolerancia al alcohol es un proceso de neuroadaptación ante el contacto con dicho tóxico. Puede aparecer como un fenómeno agudo, o ante el consumo mantenido y excesivo de etanol. Es también un factor crítico en el diagnóstico de la dependencia alcohólica, y puede además por sí misma contribuir al incremento del consumo del tóxico (Hoffman et al 2003).

El desarrollo de una tolerancia funcional aguda al etanol, que ocurre ante una única ingesta del tóxico, es una forma de adaptación rápida del organismo al mismo (Kalant et al 1971). Este cambio puede llevar a un incremento en el consumo de alcohol para recuperar

los efectos placenteros, y puede consecuentemente resultar también importante para el desarrollo de la dependencia alcohólica. Los hermanos de alcohólicos (individuos con historia familiar positiva) muestran una respuesta reducida a muchos efectos fisiológicos y subjetivos del alcohol, comparados con individuos con historia familiar negativa (Schuckit et al 1988). Estos “escasamente respondedores” al alcohol son más propensos a convertirse a su vez en alcohólicos dependientes, lo que sugiere que la pobre respuesta al etanol conduce a un más rápido desarrollo de tolerancia enólica (Newlin et al 1990). En ese caso, el desarrollo de una tolerancia aguda podría ser un indicador o un elemento contribuyente a la susceptibilidad a la dependencia alcohólica.

Tolerancia crónica a los efectos del etanol

La tolerancia crónica al alcohol aparece tras largos periodos de exposición al tóxico. Existen evidencias sobre la relación entre la tolerancia aguda y el padecimiento posterior de una tolerancia crónica, y que los receptores NMDA poseen un papel en ambos tipos de fenómenos de neuroadaptación (Wu et al 2001). Algunos trabajos con roedores de laboratorio expuestos al alcohol y a antagonistas NMDA en diferentes entornos ambientales sugieren que el bloqueo de los NMDA no interfiere en el desarrollo de la tolerancia enólica *per se*, sino que bloquea selectivamente la tolerancia adquirida mediante el aprendizaje (LeBlanc et al 1973, Lê et al 1980, Szabo et al 1994). En todo caso, existen evidencias convincentes acerca de la existencia de una relación compleja entre los receptores NMDA y el fenómeno de la tolerancia aguda y crónica, y sobre la hipótesis de que la tolerancia posee características neuroreceptoras en común con los procesos de aprendizaje y memoria (Hoffman et al 2003), los cuales en muchos momentos dependen de la actividad de los receptores NMDA (Newcomer et al 2001, Lee et al 2002, Nakazawa et al 2002, Roberts et al 2002, Wittenberg et al 2002).

Dependencia alcohólica

La dependencia por un tóxico se define como la necesidad de continuar la administración del mismo una vez se ha adquirido el hábito de su consumo. La interrupción de dicho consumo ocasionará un síndrome de abstinencia, con manifestaciones físicas y/o psicológicas.

En la dependencia se distinguen dos tipos, una psíquica, en la cual el sujeto siente un deseo irresistible de administrarse la droga, y la física, en la cual el organismo necesita la sustancia para mantener su funcionalismo normal.

Cambios en las subunidades del receptor NMDA y dependencia alcohólica

Los cambios en los receptores NMDA también se han relacionado con la dependencia alcohólica, a través de modificaciones en la densidad de determinadas subunidades NR1, como las NR1a (Zukin et al 1995), o las NR1-4 (Okabe et al 1999), que aumentan tras la exposición al alcohol y poseen mayor afinidad para los antagonistas NMDA como el etanol, por lo que la influencia de dicho tóxico potenciaría a su vez el incremento de la presencia de subunidades con alta afinidad.

Hay algunos estudios que demuestran que la inhibición de la actividad del canal en presencia de etanol se produce cuando el receptor NMDA está formado por determinadas combinaciones de subunidades receptoras. Diferentes agentes antagonistas selectivos (CGP37849, antagonista competitivo de los NMDA; L-701.324, antagonista del sitio de unión a la glicina; ifenprodil, antagonista selectivo de las subunidades NR2B; neramexano, bloqueante del canal NMDA; y etanol, como antagonista funcional de estos receptores) administrados a ratas alcoholizadas mediante infusiones intraperitoneales de alcohol, demostraron que la inhibición de la función NMDA, con independencia del agente utilizado, es suficiente para la reducción del índice de recaídas alcohólicas (Vengeliene et al 2005).

Abstinencia alcohólica y anhelo (craving) por el alcohol

La hiperexcitabilidad glutamatérgica asociada a la abstinencia alcohólica puede también contribuir a otros aspectos clínicos de la abstinencia, como el incremento del anhelo por el alcohol (*craving*). La ansiedad es uno de los síntomas de la abstinencia enólica, y el efecto ansiogénico de la abstinencia puede contribuir al incremento en el consumo de alcohol, dado que, tal y como se ha descrito previamente, el alcohol posee efectos ansiolíticos. Actualmente se asume que el *craving* está estrechamente relacionado con la disregulación glutamatérgica. En un muy reciente estudio realizado mediante resonancia magnética espectroscópica para cuantificar los niveles de glutamato en el núcleo accumbens y el córtex cingulado anterior, se objetivó que los niveles de glutamato en el córtex eran mayores en los pacientes alcohólicos que en los controles, y que la intensidad del *craving* se correlacionaba positivamente con los niveles de glutamato y glutamina en ambas zonas cerebrales. Estos niveles descendían drásticamente tras la desintoxicación de etanol, corroborando los estudios previos sobre animales que sugerían que la disfunción glutamatérgica estriatal se relaciona con la abstinencia alcohólica (Bauer et al 2013).

Los antagonistas competitivos NMDA en la amígdala al parecer reducen la ansiedad asociada a la abstinencia enólica en ratas (Gatch et al 1999). Además, durante y

tras la abstinencia alcohólica la densidad y número de neuronas dopaminérgicas espontáneamente activas en el área ventral tegmental de ratas y la liberación de dopamina en el núcleo accumbens están reducidos, y dichos cambios pueden revertirse mediante la administración de un antagonista NMDA (Rossetti et al 1991, Diana et al 1993)), sugiriendo que la sobre-regulación de los receptores NMDA durante la abstinencia enólica, tanto en neuronas en el núcleo accumbens o el área ventral tegmental, podría incrementar el nivel de inhibición de la liberación de dopamina en el núcleo accumbens, incrementando la clínica de ansiedad. Este mecanismo a su vez estimularía el aumento de la ingesta alcohólica, que revertiría la inhibición inducida por el glutamato de la liberación de dopamina (Imperato et al 1986, Weiss et al 1993). De hecho, en un experimento con ratas que podían auto-administrarse alcohol durante la abstinencia, los animales ingerían etanol en la cantidad suficiente como para que la liberación de dopamina retornara a un nivel similar al de los controles (Hoffman et al 2003).

Estos cambios a corto plazo en los NMDA no explican por sí mismos el anhelo a largo plazo (*craving*) por el alcohol que ocurre en individuos dependientes del tóxico. Los resultados de un estudio que medía niveles de glutamato en ratas expuestas al alcohol en una y en repetidas ocasiones parecen sugerir que las respuestas condicionadas por la concentración de glutamato extracelular podrían participar en el *craving* inducido ante señales pre-conocidas para el etanol, que se ha descrito frecuentemente implicado en las recaídas de los alcohólicos detoxificados (De Witte et al 2004).

Los receptores glutamatérgicos y la farmacoterapia de la dependencia alcohólica

El conocimiento de la relación entre los receptores glutamatérgicos y la dependencia alcohólica puede ser muy útil para desarrollar nuevos tratamientos farmacológicos que permitan reducir el consumo de alcohol y prevenir algunas de las consecuencias del mismo (Davis et al 1994), utilizando antagonistas de los receptores NMDA aceptables para su uso clínico para el tratamiento de la abstinencia (Snell et al 2000, Nagy et al 2004b).

Sin embargo, aún son escasos los estudios *in vivo* que han explorado el rol de la disfunción glutamatérgica en los pacientes alcohólicos (Gass et al 2008). Por ejemplo, la administración del antagonista NDMA ketamina en alcohólicos redujo los síntomas negativos, la psicosis, la disforia y la pérdida de funciones cognitivas (Krystal 2003). El topiramato, antagonista AMPA y kainato, también se utiliza en el tratamiento de la dependencia alcohólica (Johnson et al 2003). La memantina y otros antagonistas glutamatérgicos redujeron el anhelo o ansia de consumo de etanol (*craving*) (Krupitsky

2007). Otro antagonista no competitivo, el neramexano inhibió tanto el desarrollo como la expresión de la dependencia alcohólica a dosis de un mínimo de 3.5 mg/kg. A dosis menores (un mínimo de 1.75 mg/kg) inhibió la adquisición y expresión de la preferencia por el etanol (Kotliska et al 2004).

En el año 2004 la FDA aprobó el uso del acamprosato (Campral) para el tratamiento del *craving* e impedir la recaída tras la abstinencia alcohólica, tras la publicación de resultados de estudios que demostraron su eficacia (Kranzler et al 2001) y posteriormente corroborados (Roesner et al 2008). El acamprosato actúa como antagonista a altas concentraciones, o como agonista parcial de los NMDA a concentraciones bajas (Rammes 2001). El mecanismo de acción del acamprosato no está totalmente aclarado, pero se ha visto en una serie de estudios que altera las respuestas mediadas por el receptor NMDA y que puede interactuar con el sitio de la poliamina en dicho receptor, reduciendo la toxicidad inducida por la poliamina en los cultivos organotípicos hipocámpales durante la abstinencia alcohólica. También ha mostrado su capacidad de reducción del consumo de alcohol en animales sometidos al efecto de privación alcohólica (Rimondini et al 2002).

Abstinencia alcohólica e hiperexcitabilidad glutamatérgica. Convulsiones por abstinencia

La abstinencia de alcohol en un organismo acostumbrado a su ingesta puede relacionarse con tres diferentes síndromes clínicos: la abstinencia alcohólica no complicada, las convulsiones por abstinencia alcohólica, y el delirio por abstinencia (delirium tremens).

En la hipótesis glutamatérgica los tres síndromes pueden poseer un único mecanismo fisiopatológico: la capacidad inhibitoria del etanol, al ser consumido de forma regular, para provocar un incremento compensatorio del número de receptores NMDA (sobre-regulación adaptativa). Esta potencial hipersensibilidad glutamatérgica en la superficie sináptica podría manifestarse ante la eliminación súbita del alcohol (abstinencia alcohólica), a través del incremento de la actividad de las neuronas glutamatérgicas postsinápticas (hiperexcitabilidad). Al cesar el estímulo antagonista del alcohol se provocaría como consecuencia la sobre-activación del sistema glutamatérgico, al quedar liberados un número incrementado de receptores. En esas circunstancias la estimulación postsináptica y los efectos catecolaminérgicos podrían verse considerablemente incrementados de forma reversible. La consecuencia final de dicha hiperestimulación glutamatérgica serían las diversas manifestaciones clínicas de la abstinencia alcohólica. La hipersensibilidad de la neurotransmisión mediada por los receptores NMDA podría explicar la incapacidad de los

agonistas GABAérgicos como las benzodiazepinas para controlar adecuadamente los casos severos de abstinencia alcohólica y el delirium tremens, a pesar de ser administrados a altas dosis, ya que muchos de dichos agonistas no poseen ningún efecto sobre el sistema glutamatérgico.

El uso de microdiálisis en animales ha demostrado de forma consistente que durante los ciclos de intoxicación y abstinencia aumenta significativamente el glutamato extracelular (Rossetti et al 1999, Gu et al 2012). Además, el acamprosato, un homólogo de la taurina y antagonista glutamatérgico, reduce los niveles de glutamato extracelular (De Witte 2004, Hinton et al 2012). Este incremento del glutamato durante la fase inicial de la abstinencia es el resultado de los cambios en la sensibilidad de los receptores NMDA (sobre-regulación adaptativa), e implica que al cesar bruscamente el consumo del tóxico se produzca un desbloqueo de un número superior al normal de dichos receptores. Éstos, al activarse por la presencia de agonistas fisiológicos como el glutamato, pueden inducir fenómenos de hiperexcitabilidad, particularmente en el hipocampo. En estudios electrofisiológicos sobre cortes hipocampales preparados de ratón en fase de abstinencia alcohólica, el componente mediado por los NMDA de la excitación sináptica se incrementaba durante la abstinencia. Dicha hiperexcitabilidad fue inhibida por un antagonista NMDA, y se detectó un aumento de las descargas dependientes de los NMDA en el *gyrus* dentado en un modelo in vitro de abstinencia enólica (Whittington et al 1995).

Estos datos indican que los cambios en el sistema NMDA contribuyen de forma importante a la hiperexcitabilidad durante la abstinencia enólica, que, al asociarse a un incremento de la densidad de receptores potencialmente estimulables, pueden ser frenados o inhibidos mediante sustancias que actúen antagonizando a los receptores NMDA. Así, antagonistas que actúan en diferentes sitios del receptor NMDA, como los bloqueadores del canal o los antagonistas de los sitios de la poliamina y glicina, se han demostrado eficaces en el bloqueo de las convulsiones provocadas por la abstinencia enólica, cuando dichas crisis ya se estaban produciendo (Grant et al 1990, Liljequist et al 1991, Snell et al 2000). Otros autores demostraron que la supresión de las crisis convulsivas en ratas podría llevarse a cabo profilácticamente mediante la administración de antagonistas de los receptores NMDA como el acamprosato, ifenprodilo y MK-801 durante la exposición al etanol (Kotlinska et al 2001). Por otra parte, animales sujetos a episodios repetidos de abstinencia alcohólica desarrollan un incremento en su sensibilidad a las convulsiones inducidas por los agonistas NMDA, indicando un aumento en la funcionalidad del receptor NMDA (Becker et al 1998, Gonzalez et al 2001).

Más aún, el periodo de tiempo durante el cual, tras cesar la ingesta de alcohol, la densidad de receptores NMDA funcionantes se mantiene superior a la basal (periodo susceptible de fenómenos relacionados con la hiperexcitabilidad glutamatérgica, y por tanto con la excitotoxicidad derivada) en el hipocampo de ratón, corre paralelo al periodo en el que pueden manifestarse las convulsiones por abstinencia alcohólica, de manera que los niveles de NMDA vuelven a los basales a las 24 horas de abstinencia, cuando los signos claros de abstinencia alcohólica han desaparecido (Gulya et al 1991). En un estudio sobre la densidad de los receptores NMDA y AMPA en membranas neuronales del prosencéfalo (encéfalo anterior) de ratas expuestas durante 84 horas a una severa intoxicación por etanol, y decapitadas posteriormente a las horas 0, 12 y 36 de la última dosis alcohólica, usando ligandos específicos ($[^3\text{H}]$ MK-801 y $[^3\text{H}]$ AMPA), los autores detectaron una B_{max} del $[^3\text{H}]$ MK-801 igual a la de los controles en la hora 0, un incremento del 49% de la unión (*binding*) a las 12 horas, y del 24% a las 36 horas (Haugbol et al 2005). Cuando las mediciones de los niveles de dichos receptores se efectuaron pasadas las 48 horas de abstinencia de etanol no se objetivaron cambios en la densidad de los receptores NMDA (Tremwel et al 1994).

En las subunidades NMDA se han detectado cambios en sus niveles en el hipocampo de rata también que revierten en un tiempo corto, aproximadamente 48 horas tras iniciarse la abstinencia. En un estudio sobre córtex de roedores se objetivaron elevaciones en los niveles en el ARNm correspondiente a las subunidades NR2B durante la exposición alcohólica crónica, retornando a niveles similares a los de los controles a las 18 horas de abstinencia. En cambio, se observaron disminuciones en los niveles de ARNm correspondiente a las subunidades NR1 en su variante 5', que se mantuvieron durante la exposición al tóxico y durante las primeras 48 horas de abstinencia. Los resultados apoyaban la hipótesis de la neuroadaptación al etanol crónico a través de modificaciones en las subunidades del receptor NMDA, y que dichos cambios podrían ser importantes en la precipitación de la hiperactividad de la abstinencia alcohólica (Hardy et al 1999).

Un grupo de investigadores estudiaron el gen que codifica la subunidades NR1 de los NMDA (GRIN1), y compararon la expresión de diferentes alelos, objetivando que determinados genotipos y alelos se asociaban con el padecimiento de convulsiones durante la abstinencia alcohólica, con independencia de los años de consumo, la edad de inicio o la historia de delirium tremens (Rujescu et al 2005).

Abstinencia alcohólica y neurotoxicidad

En la hipótesis glutamatérgica de los déficits neurológicos provocados por el alcohol, el déficit de memoria de los pacientes alcohólicos, como en los casos de encefalopatía de Wernicke, podrían ser el resultado de la degeneración neuronal mediada por la excitotoxicidad inducida por el etanol. La excesiva y persistente activación de los receptores glutamatérgicos puede causar degeneración neuronal. Un número suficiente de neuronas definitivamente lesionadas llegaría a condicionar un déficit permanente, que clínicamente se manifestaría atendiendo a la tarea neurológica de la zona cerebral afectada.

El incremento de la densidad de receptores NMDA en la ingesta crónica alcohólica podría llevar al cerebro a una mayor susceptibilidad a los insultos excitotóxicos, como la anoxia o el trauma cerebral. Es interesante destacar que el hipocampo, el córtex cerebral y el cerebelo, regiones todas ellas donde el glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio, son altamente susceptibles a los efectos deletéreos del alcoholismo. El solapamiento entre el perfil neuroanatómico de los receptores NMDA y las lesiones inducidas por el etanol es más evidente en el hipocampo. Éste posee el glutamato como principal transmisor en sus circuitos intrínsecos y en sus conexiones con otras áreas cerebrales, y es la región cerebral más vulnerable a la neurotoxicidad por etanol. Es en esta área cerebral además donde se produce el fenómeno de la potenciación a largo plazo (PLP), que equivale a un análogo celular de la memoria reciente. Las alteraciones cognitivas y de memoria que ocurren durante el abuso prolongado de etanol podrían ser explicadas por la alteración mantenida de la transmisión NMDA, alterando los mecanismos de la PLP, e induciendo déficits en la función neuronal hipocampal que implicarían a la adquisición de la memoria.

Además de la afectación focalizada de las funciones hipocampales, a un nivel más global se ha sugerido que el alcoholismo crónico podría lesionar de forma permanente el córtex cerebral, provocando la pérdida neuronal y finalmente la atrofia cerebral difusa objetivable macroscópicamente. Estas lesiones permanentes se establecerían a través de fenómenos de excitotoxicidad mediada por el sistema glutamatérgico, y relacionada con la situación mantenida de supersensibilidad de los receptores NMDA secundaria a la sobre-regulación adaptativa al consumo crónico del tóxico. Los pacientes alcohólicos padecen a lo largo de su vida múltiples y continuos cambios en la concentración plasmática y en los niveles de alcohol en el tejido cerebral. Dichos cambios condicionan las muy diversas manifestaciones clínicas de estos enfermos. Por ejemplo, las pituitas matutinas (náuseas y vómitos pre-pandriales) son manifestación de los cambios en la alcoholemia y la

disautonomía establecida en estos pacientes. La excitotoxicidad a nivel del córtex cerebral, que contiene abundantes receptores NMDA, y que desempeñan un papel integral en la transmisión córtico-cortical y córtico-fugal, aportaría una explicación plausible para el déficit global cognitivo que hallamos frecuentemente en el deterioro neurológico asociado al alcoholismo.

El incremento en la funcionalidad de los NMDA durante la abstinencia alcohólica en animales puede implicar una susceptibilidad aumentada a la excitotoxicidad. Está generalmente aceptado que el receptor NMDA posee un importante papel en la muerte neuronal por excitotoxicidad inducida por el glutamato (Choi et al 1992), y que tal daño puede ser incrementado tras la exposición crónica al etanol y la abstinencia. Estudios en ratas expuestas crónicamente al etanol demostraron que eran más sensibles que los controles a los efectos de la inyección intrahipocampal de NMDA, la cual produce una disminución de la actividad de la glutamatodecarboxilasa y la muerte neuronal (Davidson et al 1993). Además, sobre cultivos de neuronas granulosas cerebelosas, hipocampales y corticales han detectado que la neurotoxicidad inducida por el glutamato y el neurotransmisor NMDA se incrementa en células crónicamente expuestas al etanol y a la abstinencia (Iorio et al 1992, Al Qatari et al 2001). Por otra parte, la neurotoxicidad en hipocampo tras la abstinencia alcohólica, sin necesitar la adición de ningún componente exógeno, puede bloquearse por un antagonista NMDA, el MK-801, y por el ifenprodilo (Mayer et al 2001), hecho que también apoya el argumento de que la sobre-regulación glutamatérgica de los NMDA tras la exposición crónica al etanol puede generar lesiones neuronales.

En relación a la localización de los receptores NMDA, hay autores que sugieren que la activación de los receptores NMDA extrasinápticos conlleva la muerte de las neuronas cultivadas hipocampales, mientras que la activación de los receptores sinápticos puede proteger a la célula de la muerte (Hardingham et al 2002), aunque otros estudios parecen indicar que la activación de receptores NMDA sinápticos o extrasinápticos puede producir toxicidad dependiendo en realidad de la localización del glutamato liberado (Sattler et al 2000). Si los receptores extrasinápticos están primitivamente envueltos en la toxicidad mediada por el glutamato, entonces un cambio en la proporción de receptores sinápticos y extrasinápticos durante la exposición al etanol y/o la abstinencia posterior podría alterar la susceptibilidad de las neuronas a la toxicidad inducida por el glutamato o el NMDA, contribuyendo a la hiperexcitabilidad de la abstinencia alcohólica (Hoffman et al 2003).

ESTUDIOS PUBLICADOS SOBRE TEJIDO HUMANO DE LAS ALTERACIONES PROVOCADAS POR EL ALCOHOL EN EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO CEREBRAL HUMANO

A pesar de existir abundante bibliografía acerca de la interrelación entre el sistema glutamatérgico, el consumo de alcohol y la detección de lesiones en el SNC en animales, son muy escasos los trabajos realizados sobre tejido humano. Las causas principales de esta escasez son por una parte la dificultad, por causas médico-organizativas y éticas, para conseguir las muestras adecuadas, siempre provenientes de necropsias, y por otra la limitación a la hora de establecer una historia clínica detallada de los antecedentes médicos y del historial referente al consumo de etanol y otros tóxicos por parte del paciente.

En la actualidad se desconoce si los cambios que se han demostrado en los animales de laboratorio ocurren también en los cerebros de los humanos alcohólicos que poseen una larga historia y signos físicos de consumo excesivo de alcohol. Si los cambios descritos en los capítulos anteriores en los receptores glutamatérgicos también aparecen en estos pacientes, las alteraciones en la actividad glutamatérgica podrían explicar parte de las alteraciones clínicas provocadas por el alcohol, como la abstinencia alcohólica, así como las lesiones histológicas asociadas al alcoholismo crónico.

Experimentos sobre membranas celulares

1.- Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. (Michaelis et al 1990)

Los autores estudiaron los cambios en la unión del glutamato a sus receptores específicos sobre membranas sinápticas aisladas de hipocampo, provenientes de necropsias efectuadas a seis alcohólicos (con historia clínica y signos clínicos demostrados de consumo crónico excesivo de etanol) y cinco controles, sin diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la edad y al tiempo de extracción de las muestras a partir del fallecimiento de cada individuo.

La primera fase del estudio consistía en explorar posibles cambios en la intensidad de unión al [³H]glutamato y al [³H]CPP (ácido 3-(2-Carboxipiperazin-4-yl)propil-1-fosfónico, un potente, selectivo y competitivo antagonista de los NMDA). Se observó que las membranas sinápticas preparadas de individuos alcohólicos poseían una densidad significativamente mayor de receptores para el glutamato (NMDA, kainato y quisqualato) que las de los controles, cuantificada mediante la B_{max} para el [³H]glutamato. Por otra parte, en estos mismos homogeneizados de alcohólicos se delimitaba claramente una

subpoblación de sitios de unión al [³H]glutamato, que representaba aproximadamente el 10% del total de sitios de unión de las membranas sinápticas, con una clara especial afinidad hacia el ligando, con una K_D entre 0.4 y 0.6 μ M. Esta diferencia entre dos subpoblaciones diferentes de receptores no se objetivó en los homogeneizados de los controles, por lo que se deducía que en las membranas hipocampales de los alcohólicos existían sitios de unión de alta y baja afinidad al [³H]glutamato.

Además se detectó que las membranas de los alcohólicos exhibieron descensos en la densidad de unión al [³H]CPP, ligando específico de los receptores NMDA, en comparación con las membranas de los controles. Por tanto, podía deducirse que la subpoblación de receptores NMDA no sólo no participaba en el incremento de la B_{max} para el L-[³H]glutamato, sino que de hecho padecía una disminución en su densidad. Las membranas hipocampales fueron expuestas a cuatro concentraciones diferentes de ligando radiactivo [³H]CPP (entre 100 y 600 nM). Los autores detectaron que la densidad de unión al ligando, medida mediante la B_{max} de los sitios de unión al CPP en las membranas de los alcohólicos, era tres veces menor a la de los controles, aunque la constante de disociación K_D indicaba una afinidad tres veces superior para la unión del [³H]CPP a los mismos receptores. Dado que la activación de los receptores del kainato y quisqualato es responsable de la despolarización inicial que acaba condicionando el desbloqueo de los receptores NMDA, los autores sugirieron que el incremento en el número de los receptores kainato y quisqualato podría representar una respuesta adaptativa a la acción inhibitoria del etanol sobre los NMDA y otros receptores glutamatérgicos.

Seis años más tarde, otro grupo de investigadores aportaba algunos datos sobre el trabajo de Michaelis no incluidos en el artículo (Freund et al 1996). De los consumidores de alcohol, cinco estaban en situación de intoxicación aguda por alcohol en el momento de la defunción, demostrada por una alcoholemia positiva. Tres de los controles también tenían cifras no concretadas de alcoholemia a dosis de intoxicación aguda en el momento de la defunción. La unión específica del antagonista competitivo CPP a los NMDA se vio disminuida en tres veces (de 1800 a 510 fmol/mg de proteína), disminuyendo la K_D de la unión del CPP tritado en alcohólicos de 0.58 a 0.16 μ mol (lo cual se corresponde a un incremento en tres veces de la afinidad del ligando por el receptor).

2.- Amino Acid Neurotransmitter receptor changes in cerebral cortex in alcoholism: effect of cirrhosis of the liver. (Dodd et al 1992)

Este estudio fue realizado sobre homogeneizados de membranas celulares de córtex cerebral de pacientes alcohólicos, diferenciando cirróticos y no cirróticos, y

comparando los resultados con un grupo control, formado por no consumidores de alcohol y sin patología hepática. Además de analizar la densidad de receptores gabaérgicos en el *gyrus* frontal superior en los pacientes alcohólicos, se describía un estudio comparativo de los receptores NMDA, justificado dada su relación opuesta con el sistema GABAérgico. Al realizar el radioanálisis de la densidad de los receptores NMDA mediante [³H]MK-801, los autores no observaron variaciones estadísticamente significativas entre los diferentes grupos a estudio.

3.- Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes during chronic alcohol intake. (Michaelis et al 1993)

En este artículo los autores realizaban una revisión de los resultados obtenidos tres años antes, ampliando algunos de los datos de laboratorio, como la proporción de los diferentes subtipos de receptores glutamatérgicos detectables con L-[³H] glutamato. Confirmaron la presencia de una pequeña subpoblación de sitios de unión al glutamato en los alcohólicos, con una más alta afinidad por el agonista natural que en los controles, un hallazgo sólo detectado en muestras de cerebros humanos, pero no en animales.

Los autores planteaban por fin que los estudios realizados sobre animales de experimentación, aún los que habían sido expuestos al alcohol durante 14 días, podrían no ser un buen modelo para determinar los cambios en humanos alcohólicos. Por otra parte, hipotetizaban que el incremento detectado de la afinidad de los receptores NMDA, acompañado del decremento en la densidad total de dichos receptores (cuantificada mediante la Bmax), podrían aumentar la probabilidad de activación de los receptores NMDA por el L-glutamato liberado por las neuronas tras la despolarización, aunque globalmente disminuyera la contribución global de dichos receptores a la respuesta excitatoria tras la activación glutamatérgica. Tal respuesta adaptativa podría indicar que las neuronas en el cerebro de los alcohólicos crónicos se convierten progresivamente en más dependientes del incremento de densidad de otros tipos de receptores glutamatérgicos, como los kainato/AMPA y los receptores metabotrópicos.

4.- Glutamate receptor subtype expression in human postmortem brain tissue from schizophrenics and alcohol abusers (Breese et al 1995)

En este estudio se examinó la expresión de los receptores glutamatérgicos en el tejido cerebral obtenido post-mortem de un grupo de 14 enfermos esquizofrénicos. Dentro del grupo control, los autores diferenciaron entre 10 consumidores y 9 no consumidores de alcohol. Mediante anticuerpos de rata frente a las subunidades de los receptores

glutamatergicos no NMDA GluR1, GluR2, GluR3 y GluR5, se estudió la distribución de dichas subunidades de receptor en el hipocampo y el córtex cingulado, sobre homogeneizados de membranas neuronales, mediante la técnica de Western-Blott.

Los resultados obtenidos apuntaban a que el abuso de alcohol ejercía un escaso efecto en la expresión de GluR1 y GluR5 en el hipocampo, o de GluR2 y GluR3 en el córtex cingulado. Sin embargo, detectaron un importante incremento en los niveles de GluR2 y GluR3 en el hipocampo de los alcohólicos, comparado con el grupo control. Estos datos sugerían que podrían existir incrementos en subtipos específicos de receptores glutamatergicos en los cerebros de consumidores crónicos de etanol.

Estudios inmunohistoquímicos

Un reciente estudio publicado por un grupo de investigadores australianos, determinó mediante PCR el ARNm de las subunidades NR1, NR2A y NR2B de los NMDA en cortex frontal superior y cortex primario motor de 22 alcohólicos no cirróticos, 13 alcohólicos cirróticos y 20 controles (Ridge et al 2008). La expresión de las tres subunidades era significativamente más baja en ambas áreas sólo en el caso de los alcohólicos cirróticos, sugiriendo que los cambios en los NMDA no eran debidos a la ingesta alcohólica en sí, sino a las lesiones asociadas a la hepatopatía, como la hiperamoniemia.

Estudios autorradiográficos

1.- The effect of chronic ethanol on glutamate binding in human and rat brain (Cummins et al 1990)

En este estudio, realizado sobre muestras de tejido hipocampal de 10 alcohólicos abstinentes y 10 controles y sobre un grupo de ratas, los autores detectaron una disminución significativa en la densidad de los NMDA en la región CA1, tanto en los humanos alcohólicos como en los roedores. En el caso de estos últimos, la densidad de receptores detectados al cabo de 24 horas de abstinencia de alcohol resultó un resultado intermedio entre los obtenidos en controles y en animales bajo el efecto del alcohol. No detectaron cambios similares en córtex frontal o en el núcleo caudado.

2.- Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics (Freund et al 1996)

Los autores seleccionaron 13 cerebros histológicamente normales de alcohólicos y 13 de controles, emparejados por edad, intervalo post-mortem y tiempo de conservación del tejido. Se recogió una completa historia clínica sobre el consumo de alcohol de los

individuos consumidores, incluyendo episodios de abstinencia, intoxicación aguda y de desintoxicación. El consumo de alcohol mínimo fue de 80 gramos al día durante al menos 10 años, pero como mínimo debían haberse mantenido en abstinencia total durante los 14 días antes de su muerte.

La densidad máxima de unión y la afinidad de unión fueron determinadas mediante autorradiografía cuantitativa en el área 8 de Brodmann, en el córtex frontal superior. Aunque la unión del glutamato tritiado a los receptores NMDA estaba aumentada entre alcohólicos con respecto a controles (B_{max}), no se objetivaron diferencias en la K_D . Dado que antes de la muerte los alcohólicos se habían mantenido en abstinencia como mínimo dos semanas, la densidad de receptores frontales se relacionaría al consumo crónico de etanol. En todo caso, las diferencias entre alcohólicos y controles no eran atribuibles a diferencias en la edad, tiempo entre fallecimiento y congelación del tejido, tiempo de almacenamiento, estado de agonía, enfermedades hepáticas por el alcohol, déficit de tiamina sugestivo de encefalopatía de Wernicke, hipoxia aguda por neumonía, hipoxia crónica por neumoopatía crónica, o medicaciones con efecto psicotrope como las benzodiazepinas, barbituratos, opiáceos, drogas colinérgicas o atropina. Globalmente la afinidad de estos receptores por los agonistas no era significativamente diferente. Otro hallazgo fue que el tiempo transcurrido entre la muerte y la congelación no afectaba, dentro de unos amplios límites (hasta 72 horas) los resultados de los estudios posteriores. Así mismo, dado que se había descrito que la forma de agonía y muerte (el “status agónico”) aumentaba la unión al MK-801 tritado en el córtex humano postmortem (Piggot et al 1992), se incluyó este dato en la base de análisis.

3.- Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus, and cerebellar vermis of alcoholics (Freund et al 1999)

Aparentemente, los investigadores de la publicación anterior siguieron estudiando, mediante técnicas autorradiográficas, muestras cerebrales procedentes de los 26 individuos estudiados tres años antes. Se determinó la unión o afinidad a los receptores NMDA mediante autorradiografía cuantitativa en tres áreas cerebrales: el córtex cingulado, el *cornu Ammonis* del hipocampo, y el vermis cerebeloso.

Como en el estudio anterior, los investigadores utilizaron un agonista, el L- $[^3H]$ glutamato, un antagonista competitivo, el $[^3H]$ CGP-39653, y un antagonista con unión en el interior del canal, el $[^3H]$ MK-801. En ninguna de las tres áreas estudiadas se detectaron diferencias entre alcohólicos y controles en cuanto a la densidad y afinidad de los receptores.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA ASOCIADOS A LA INGESTA REGULAR DE ALCOHOL

Según la hipótesis glutamatérgica, el consumo regular de dosis suficientes de alcohol puede provocar cambios funcionales en el número de receptores NMDA en determinadas áreas cerebrales, tal y como ya hemos descrito en los capítulos precedentes. En los consumidores crónicos de alcohol está incrementado el glutamato en el medio, aunque, por otra parte, como antagonista del receptor, el etanol disminuye directamente su capacidad funcional, reestableciéndose un aparente equilibrio de fuerzas. Sin embargo, debido al fenómeno de la sobre-regulación adaptativa, el consumo regular de alcohol produce un incremento en la densidad real de receptores NMDA en el tejido. Estos cambios funcionales de los receptores no necesariamente implicarían déficits neurológicos o psiquiátricos detectables en vida del consumidor de alcohol.

En el momento en que el etanol desaparece del medio al cesar su ingesta, un número aumentado de receptores quedan liberados, lo que determinará una respuesta glutamatérgica aumentada y una potencial hipersensibilidad glutamatérgica en la superficie sináptica, responsable de la clínica de la abstinencia aguda del alcohol. En el caso de los roedores utilizados en los estudios, las alteraciones en la densidad NMDA son reversibles en 24-48h, y tras la normalización en la densidad de dichos receptores revierte la clínica de abstinencia, incluidas las convulsiones. En la actualidad no se disponen de estudios que demuestren estos cambios funcionales en el cerebro humano, aunque sería razonable hipotetizar, dado que el período clínico de abstinencia aguda alcohólica puede prolongarse hasta una semana, que podrían detectarse cambios en la densidad de los receptores NMDA más allá de las primeras 48 horas.

Un estudio autorradiográfico efectuado sobre tejido cerebral de individuos consumidores crónicos de etanol, que hubieran consumido alcohol hasta unas horas antes de su fallecimiento (y, que por tanto, no habían empezado a padecer la abstinencia aguda del alcohol), podría evidenciar una disminución en la densidad de los receptores NMDA

asociados al efecto antagonista del alcohol, comparada con la densidad obtenida en individuos no consumidores.

ALTERACIONES PERMANENTES EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA. LESIONES GLUTAMATÉRGICAS IRREVERSIBLES

El consumo excesivo y mantenido de alcohol finalmente produciría cambios irreversibles en la densidad de receptores NMDA. Tras un largo período de equilibrio adaptativo (aumento de densidad de receptores asociado a inhibición funcional por el etanol) se produciría el fracaso final de los mecanismos de sobre-regulación adaptativa. Debido a la disminución resultante de la densidad de receptores NMDA funcionales las neuronas no podrían responder adecuadamente a los estímulos glutamatérgicos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis. Paralelamente, los mecanismos de excitotoxicidad repetidamente provocados por las continuas e inevitables oscilaciones en la alcoholemia contribuirían a la aparición final de lesiones neuronales irreversibles, que predominarían en las regiones donde el glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio: hipocampo, el córtex cerebral y el cerebelo.

En estos pacientes el estudio selectivo autorradiográfico en las áreas cerebrales afectadas demostraría una disminución en la densidad de receptores NMDA permanente, al margen del posible efecto de frenación funcional descrito en el apartado anterior. Por tanto, al estudiar muestras de tejido cerebral de consumidores crónicos de alcohol que hubieran abandonado el consumo del tóxico durante como mínimo una semana antes de su defunción, podría detectarse una disminución asociada no ya a cambios funcionales en los receptores, sino a lesiones irreversibles.

Dicha disminución en la densidad de receptores NMDA podría preceder a la aparición de manifestaciones crónicas del alcoholismo, siendo por tanto detectable en consumidores “asintomáticos” (no diagnosticados en vida de complicaciones crónicas neuropsiquiátricas debidas al alcohol).

CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA ASOCIADOS A LA MUERTE SÚBITA

Un grupo de investigadores analizaron un total de 17 muestras de córtex occipital de pacientes fallecidos por diferentes circunstancias. En cuatro de ellos la causa fue la muerte súbita, entendida como la acaecida bruscamente, con independencia del diagnóstico final anatomopatológico. Los investigadores estudiaron la densidad de receptores NMDA mediante autorradiografía, utilizando el marcador MK-801 tritiado. Encontraron diferencias significativas ($p < 0.01$) en los fallecidos por muerte súbita, que presentaban una densidad de receptores mayor que la de los pacientes fallecidos por causas no súbitas, sugiriendo que el estado agónico era un factor que podía modificar las mediciones de dichos receptores (Piggot et al, 1992).

Si el estado agónico influye en los receptores NMDA, esta influencia podría detectarse también en otras áreas cerebrales, especialmente en aquellas con una mayor densidad de neuronas glutamatérgicas. En el córtex frontal e hipocampo de los individuos fallecidos por muerte súbita, por tanto, se detectarían densidades mayores de NMDA.

OBJETIVOS DEL ESTUDIO

OBJETIVOS PRINCIPALES

1.- Estudiar, mediante la técnica de la autorradiografía de receptores, la distribución y la densidad de los receptores NMDA del glutamato en diferentes áreas del SNC de un grupo de personas consumidoras regulares de diferentes dosis de alcohol, que no fueron diagnosticadas en vida de enfermedades asociadas o secundarias al abuso crónico de alcohol, y comparar los resultados con los obtenidos en un grupo de pacientes no consumidores de alcohol, denominados controles

2.- Valorar los cambios en la densidad de receptores NMDA entre dos subgrupos de consumidores crónicos de alcohol, atendiendo al mantenimiento o no de la ingesta alcohólica hasta su defunción:

- Consumidores no abstinentes, aquellos que consumieron alcohol hasta horas antes de su defunción. Sus receptores NMDA se encontraban bajo el efecto antagonista del alcohol, por lo que la densidad de receptores sería menor
- Consumidores abstinentes, aquellos que abandonaron la ingesta de alcohol un mínimo de una semana antes de su defunción. Según la hipótesis glutamatérgica la densidad de receptores NMDA sería similar a la del grupo control o menor, si ya existieran lesiones glutamatérgicas irreversibles.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

3.- Analizar las posibles diferencias en la densidad de receptores NMDA entre los consumidores crónicos de alcohol según la intensidad de la ingesta habitual, diferenciando entre:

- Consumidores de dosis moderadas de alcohol (40-80g/día)
- Consumidores de dosis altas de alcohol (>80g/día)

4.- Estudiar las posibles diferencias en la densidad de receptores entre consumidores de alcohol atribuible a las circunstancias de la defunción, diferenciando dos grupos:

- fallecidos por muerte súbita
- fallecidos por causas que no condicionaron una muerte súbita

MATERIAL Y MÉTODOS

INTRODUCCIÓN A LA TÉCNICA DE LA AUTORRADIOGRAFÍA DE RECEPTORES

La técnica de autorradiografía de receptores permite la visualización a nivel anatómico de los sitios de unión de un determinado compuesto que están presentes en secciones de tejido. Para ellos se incuban secciones de tejido de pocas micras de grosor con un radioligando, compuesto marcado con un isótopo radiactivo en su estructura química que emite radiaciones ionizantes (emisiones β o γ dependiendo del isótopo). Este isótopo en condiciones adecuadas se fijará a sus sitios de unión en el tejido. Posteriormente, cuando las secciones incubadas se exponen a filmes fotográficos, las emisiones de los isótopos radiactivos incorporados al tejido convierten los iones de plata de la emulsión fotográfica en átomos de plata, los cuales se reducen a plata metálica cuando el film es revelado, produciendo la imagen autorradiográfica de la distribución del radioisótopo. En la actualidad existen comercializados filmes con emulsión fotográfica sensible a la emisión radioactiva del isótopo empleado, generalmente ^3H . Las imágenes autorradiográficas obtenidas después de la exposición y revelado de los filmes pueden ser cuantificadas empleando métodos de análisis de imágenes. La cuantificación de esta señal autorradiográfica se consigue después de haber calibrado el sistema de medida con patrones (disponibles comercialmente) con cantidades conocidas de material radioactivo que nos permiten transformar los datos medidos de densidad óptica en unidades de radioactividad por cantidad de tejido ($\mu\text{Ci}/\text{mg}$ tejido). Posteriormente y a partir de la actividad específica del radioligando podremos calcular la cantidad de moléculas del compuesto marcado que se une al tejido en estudio (fmol/mg tejido). La figura 6 muestra de forma resumida los pasos de la técnica.

Un factor importante en los estudios de fijación por métodos autorradiográficos es la determinación de la unión no específica del radioligando a la muestra analizada. Esta determinación se realiza añadiendo otro fármaco no marcado (“frío”) del que se sabe previamente que también se une a los sitios de unión que queremos caracterizar. Obviamente, cuanto mayor sea la diferencia entre la unión total del radioligando y la unión no específica de éste, mejor optimizado estará el ensayo.

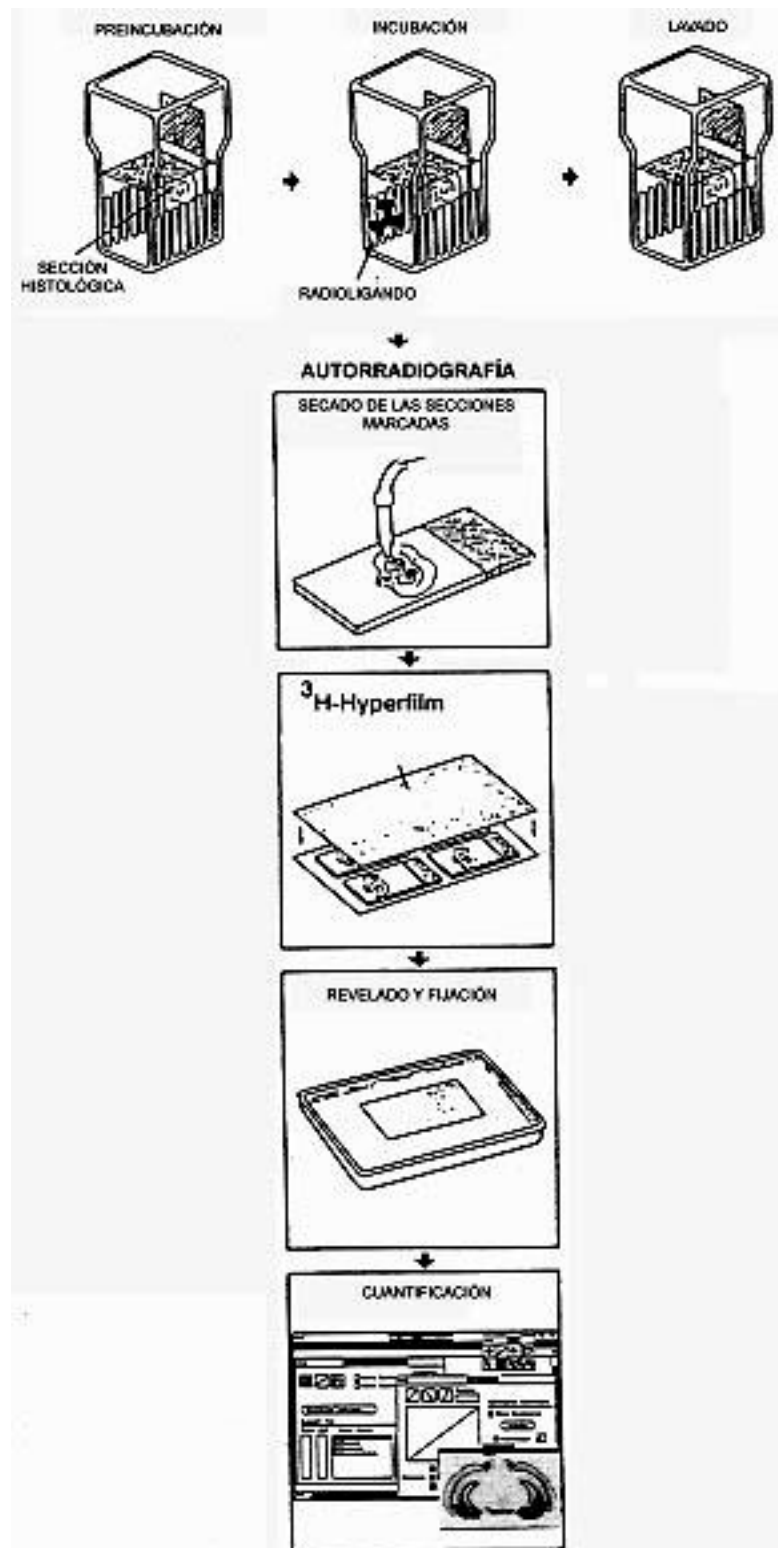


Figura 6. Esquema del experimento autorradiográfico (adaptado de E.Ruberte, 1988)

El método de la autorradiografía de receptores consta de una serie de pasos esenciales que se mantienen constantes y que son independientes del radioligando utilizado, y que se describen a continuación.

Preincubación e incubación de las muestras

La autorradiografía de receptores se realiza sobre secciones de tejido de 10-20 μm de espesor, obtenidas a partir del tejido congelado y montadas sobre porta-objetos. Las secciones se mantienen guardadas a -20°C . Cuando van a ser utilizadas, las secciones de tejido se dejan descongelar a temperatura ambiente bajo corriente de aire. Una vez secas se preincuban sumergiéndolas en tampón, que suele ser de la misma composición que el empleado para la incubación. La finalidad de esta preincubación es conseguir que se libere el ligando endógeno, glutamato en nuestro caso, presente en el tejido. Una vez finalizado el periodo de preincubación se procede a incubar las secciones en el tampón idóneo con una concentración determinada de radioligando. Durante esta fase de incubación, el radioligando se unirá a los receptores que se encuentren en la sección histológica del tejido. Las condiciones óptimas en las cuales se alcance el equilibrio entre ligando unido y libre dependerán fundamentalmente de dos variables, que son la temperatura de incubación y tiempo que dura ésta, así como de la composición y pH del tampón. Estas condiciones se han de determinar experimentalmente para cada radioligando.

Lavado de las secciones incubadas

Una vez finalizada la incubación se procede al lavado de las muestras. Para ello las secciones se sumergen en tampón previamente enfriado a 4°C y que se mantiene en un baño de agua/hielo durante el proceso de lavado para mantener esta temperatura. El objetivo del lavado es eliminar el ligando sobrante que no se ha unido de forma específica con el receptor, y de esta forma reducir la unión no específica.

El tiempo de lavado para cada radioligando dependerá de la velocidad de disociación de éste, y tendrá que establecerse experimentalmente para cada ligando, de forma que el procedimiento de lavado nos proporcione la máxima reducción de la unión no específica de baja afinidad, a la vez que nos mantenga la unión específica de alta afinidad. Después del lavado las secciones se sumergen brevemente en agua destilada fría con el fin de eliminar las sales provenientes del tampón del lavado, para después colocarlas en el interior de una cámara a 4°C bajo corriente de aire durante una noche (12-24 horas). Con este último paso se conseguirá el secado en frío de las secciones de tejido evitando al máximo la disociación del ligando de su sitio de unión y su difusión.

Generación y cuantificación de autorradiogramas

Una vez secas las secciones histológicas, éstas se montan sobre un soporte adhesivo y se exponen en el interior de un chasis hermético a la luz con un film apropiado. En nuestros trabajos utilizamos Hyperfilm-³H (AMERSHAM). Junto con las secciones de tejido se exponen los patrones de ³H (³H-microscales, AMERSHAM). Los chasis donde se exponen las secciones a los filmes se guardan a 4 °C hasta el momento del revelado de los filmes. El tiempo de exposición puede variar entre varios días hasta varias semanas o incluso meses. Este tiempo de exposición dependerá de la intensidad de la señal autorradiográfica obtenida, que a su vez es dependiente de la densidad de sitios de unión que hay en una región determinada del tejido, así como de la actividad específica del radioligando y de la concentración empleada de éste.

Para obtener los autorradiogramas, transcurrido el tiempo de exposición necesario, los filmes se revelan con un revelador apropiado (en nuestros trabajos es el LX24, de Kodak USA), se fijan en fijador fotográfico (AL4 de Kodak USA), se lavan y se secan.

Por último se procede a la cuantificación de la señal autorradiográfica de los filmes por métodos de análisis de imágenes. Los sistemas de análisis de imágenes empleados habitualmente constan de una cámara de vídeo que capta la luz (generada por un transiluminador) que pasa a través del film. Esta imagen captada pasa a un sistema informático que permite medir las distintas densidades ópticas del autorradiograma. Previamente se ha de calibrar el sistema con los patrones de radioactividad, de forma que el programa informático nos transforma los datos en densidades ópticas a datos de cantidad de radioactividad por cantidad de tejido. Finalmente, y a partir de la actividad específica del radioligando, se puede calcular el número de moléculas de éste que se une por miligramo de tejido (fmol/mg de tejido por ejemplo).

OBTENCIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA MUESTRA

PROCEDENCIA DEL TEJIDO NEUROLÓGICO

En este estudio se ha utilizado tejido neurológico procedente de las necropsias efectuadas a 16 pacientes consumidores de alcohol y a 16 pacientes no consumidores de alcohol, que actuaron como grupo control. El periodo de obtención del tejido cerebral fue el comprendido entre enero y diciembre de 1995. Los datos de cada uno de los casos y controles incluidos en el estudio, en relación al consumo de alcohol o de otras sustancias tóxicas, antecedentes patológicos, motivo de ingreso hospitalario (si lo hubo), la exploración física al ingreso, la evolución clínica, así como la causa y circunstancias de la defunción, incluido si se trató de una muerte súbita o no, y el tiempo transcurrido desde el fallecimiento y la extracción y congelación de las muestras cerebrales, se registraron en una hoja de recogida de datos estandarizada.

Para la obtención de dicha información se estableció una colaboración y contacto directos con el Banco de Tejidos Neurológicos de la Universitat de Barcelona-Hospital Clínic, el cual dispone de información clínica completa de todos los pacientes a los que se les realiza la autopsia. Para la presente tesis se examinaron con especial detalle todos aquellos datos que hacían referencia a los criterios de inclusión y exclusión en el estudio. En aquellos casos en los cuales los informes médicos resultaban insuficientes para decidir la inclusión o no en el estudio, se contactó directamente con familiares cercanos al finado, para recabar la información necesaria. Aquellos pacientes en los que no se pudo definir con claridad dicha información fueron finalmente desestimados para el estudio.

Durante ese periodo se analizaron las historias clínicas de 104 pacientes, a los cuales se les practicó la autopsia clínica. Así mismo, se llevó a cabo el mismo procedimiento con 22 pacientes a los cuales se había realizado la necropsia con anterioridad a 1995, cuyas muestras de tejido neurológico se almacenaban en el Banco de Tejidos Neurológicos.

Inicialmente, el tejido cerebral debía ser suministrado exclusivamente por el Banco de Tejidos. Sin embargo, debido a la escasez de autopsias clínicas practicadas a personas con antecedentes de consumo prolongado de alcohol, se solicitó el permiso de la Presidencia del Poder Judicial para la extracción de determinadas muestras de tejido neurológico de los fallecidos a los que se practicaba la autopsia judicial en el Instituto Anatómico Forense de Barcelona. De esta forma pudo obtenerse tejido neurológico de 26

pacientes que cumplían los criterios de inclusión del estudio, después de contrastar los datos clínicos que se obtenían a través de los informes de los médicos forenses con los obtenidos mediante informes médicos y/o el interrogatorio a los familiares de los difuntos.

En total quedaron almacenadas muestras de tejido neurológico proveniente de las autopsias clínicas efectuadas a 20 pacientes a través del Banco de Tejidos, y de 26 pacientes a través del Instituto Anatómico Forense de Barcelona.

En todos los casos incluidos en el estudio, el tiempo transcurrido desde la extracción del cerebro post-mortem hasta la congelación reglada de las muestras fue inferior a 36 horas. El estudio histopatológico fue realizado por el Servicio de Anatomía Patológica del HCP.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Fueron excluidos para el estudio todos aquellos que **cumplían alguno de los siguientes supuestos:**

1. Pacientes menores de 18 años, y los mayores de 75 años
2. Consumidores de alcohol pero durante un periodo inferior a 10 años
3. Antecedentes de consumo de alcohol, cuya dosis habitual aproximada no pudiera ser confirmada por historia clínica o por un familiar cercano
4. Consumidores de alcohol a dosis menores a 40g/día
5. Diagnóstico de alguna de las siguientes patologías neurológicas relacionadas con el consumo de alcohol:
 - a. Sintomatología compatible con abstinencia clínica alcohólica durante los días previos a la defunción, en el caso de consumidores abstinentes
 - b. Encefalopatía de Wernicke
 - c. Síndrome de Korsakoff. Demencia alcohólica. Atrofia cerebelosa alcohólica
6. Cualquier patología neurológica no ocasionada por el alcohol, aguda o crónica, cuyo mecanismo fisiopatogénico sea mediado total o parcialmente por la modificación molecular o funcional de los receptores del glutamato. Principalmente se descartaron las siguientes patologías:
 - a. Accidentes vasculares cerebrales en fase aguda
 - b. Traumatismos craneoencefálicos en fase aguda
 - c. Epilepsia

- d. Enfermedad de Parkinson y otras afecciones que cursan con parkinsonismo
- e. Enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, la atrofia olivopontocerebelosa, la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer o el síndrome de Gilles de la Tourette
- f. Consumo regular de opiáceos o cocaína
- g. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)
- h. Cirrosis hepática previamente diagnosticada, que hubiera cursado con clínica de descompensación y en especial con signos y síntomas de encefalopatía hepática días antes del óbito
- i. Anomalías mitocondriales y otras alteraciones bioquímicas, congénitas o adquiridas, como el síndrome de MELAS
- j. Intoxicaciones por ácido domoico, monóxido de carbono, manganeso o cianidas

De 46 individuos valorados inicialmente, 14 fueron desestimados para el estudio por diferentes criterios de exclusión. El más habitual fue la imposibilidad para confirmar los datos necesarios para elaborar su historia alcoholológica. En algunos otros el criterio de exclusión fue histológico. Por ejemplo, en un caso de un paciente consumidor de alcohol, el patólogo que realizó el estudio histológico confirmó la presencia de cambios histológicos compatibles con la enfermedad de Alzheimer, por lo que el paciente fue desestimado, a pesar de no existir antecedentes clínicos de deterioro cognitivo.

CLASIFICACIÓN EN SUBGRUPOS DE LA MUESTRA

Finalmente fueron seleccionados para el estudio un total de 16 pacientes alcohólicos y 16 controles.

Los pacientes consumidores crónicos de alcohol fueron denominados genéricamente “alcohólicos”. Este término define, para todo el estudio, sólo la ingesta regular de alcohol, sin relacionarse con la existencia o no de dependencia del tóxico.

Dentro del conjunto de alcohólicos se definieron dos subgrupos, según el período de ingesta en relación al fallecimiento:

1. Consumidores de alcohol hasta horas antes de su defunción:
Alcohólicos no abstinentes.

2. Consumidores que habían abandonado la ingesta de alcohol como mínimo una semana antes del óbito: Alcohólicos abstinentes

Así mismo, atendiendo a la dosis habitual de alcohol, se clasificaron en dos subgrupos:

1. Consumidores de dosis moderadas de alcohol: 40-80g/día
2. Consumidores de dosis altas de alcohol: >80g/día

Por último, dentro del análisis de los alcohólicos, se analizó la circunstancia de la muerte (estado agónico), definiéndose dos subgrupos:

1. Aquellos fallecidos por muerte súbita según la definición de Piggott, (Piggott et al 1992): muerte por cualquier causa de evolución rápida y no previsible, con independencia del resultado de la autopsia
2. Fallecidos por muerte no súbita

DISECCIÓN DEL TEJIDO NEUROLÓGICO

Para obtener el material histológico se procedió de la siguiente manera: una vez extraído el encéfalo se disecaba y separaba del cerebelo. Las meninges y su vascularización adyacente eran opcionalmente disecadas con la mayor delicadeza. El encéfalo así dispuesto se dividía en cortes coronales, según un protocolo preestablecido en el Banco de Tejidos Neurológicos. El hemisferio cerebeloso se dividía en cortes transversales, y el tronco cerebral en cuatro niveles (mesencéfalo, dos en protuberancia y bulbo). Una vez cortado, se separaron bloques de 5x5 cm aprox. de las siguientes áreas: córtex frontal, córtex occipital, hipocampo, cerebelo (hemisferios y vermis), el núcleo estriado, formado a su vez por los núcleos caudado y putamen, tálamo, hipotálamo, y cuatro niveles de tronco.

Estos bloques se congelaron sobre nieve carbónica en una caja cerrada durante un mínimo de 15 minutos. Posteriormente para su conservación a largo plazo el tejido se almacenó en un congelador a una temperatura de -80°C.

Las muestras obtenidas de las necropsias clínicas fueron suministradas en bloques de tejido en fresco, ya preparados por el neurólogo responsable del Banco de Tejidos para su congelación. En el caso del material obtenido a través del Instituto Anatómico Forense de Barcelona, la propia doctoranda realizó la disección del encéfalo, según el mismo protocolo del Banco de Tejidos.

El estudio histológico de las muestras de tejido fue realizado por el neurólogo responsable del Banco de Tejidos.

PREPARACIÓN DE LAS SECCIONES

De los bloques congelados se obtuvieron múltiples secciones consecutivas mediante un microtomo-criostato (2800 Frigocut, Reichert-Jung. Nussloch, Deutschland) a -20°C. Dichas secciones se montaron por descongelación en portaobjetos de vidrio previamente tratados con una solución que contiene 3-aminopropil-trietoxi-silane (APTS) al 2% con acetona, a fin de favorecer su adhesión al portaobjetos. Las secciones en los porta-objetos se guardaron de nuevo a -80°C hasta su utilización.

PROTOCOLO DEL ESTUDIO. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO AUTORADIOGRÁFICO

Los experimentos de autorradiografía de receptores se realizaron en el Departament de Neuroquímica del Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), donde ya se disponía de la infraestructura y medios necesarios. Las condiciones de incubación utilizadas fueron adaptadas a partir de las descritas por Gulya y colaboradores (1991). El primer experimento autorradiográfico se realizó para determinar las condiciones exactas de incubación para el ligando empleado, el [³H] MK 801. En el siguiente apartado se describen brevemente el primer experimento y el protocolo de estudio finalmente utilizado.

DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DEFINITIVAS DE INCUBACIÓN PARA EL LIGANDO [³H] MK 801

Condiciones variables

Con anterioridad a la realización de los experimentos definitivos debían definirse ciertas condiciones del método autorradiográfico:

1.- En primer lugar, debía probarse el tratamiento de los portaobjetos sobre los que se fijan las secciones de tejido cerebral. Los portaobjetos se preparan con diferentes soluciones, según los experimentos a realizar. En el caso del método autorradiográfico que se describe, durante este experimento se utilizaron secciones fijadas a portaobjetos tratados con glue (los cortes de cerebro humano), y otros tratados con APTS (los cortes de rata).

2.- Además, debía escogerse el tampón de incubación más adecuado para los experimentos. Existían dos opciones:

- el Tris-HCl a una concentración 50 mM (pH 7.4) (tampón I)
- el Tris-HCl a idéntica concentración y pH, pero añadiendo glutamato 100 microM y glicina a 10 microM (tampón II)

3.- Cada uno de los lavados después de la incubación podía durar durante 30 o bien 60 segundos, durante los cuales las secciones se mantenían sumergidas en el tampón, en cubetas preparadas a este fin. Debía realizarse la comparación entre ambos tiempos de lavado, e identificar el tiempo óptimo sin que las secciones se desprendieran y la lectura posterior se realizara en buenas condiciones.

4.- Por último, quedaba la cuestión fundamental de decidir qué ligando usar para la determinación de la captación inespecífica. Es decir, el ligando que se introduciría en la cubeta control, para que se uniera a los receptores NMDA, compitiendo con el ligando radiactivo. La diferencia en la captación de tritio entre el tejido tratado en esta cubeta, y la obtenida en las otras dos cubetas (T1 y T2) sería la cifra considerada como resultado en el experimento. La elección debía recaer en el glutamato 1 mM ó bien en el MK-801 a 5 μ M.

Por dichas razones se decidió realizar un primer experimento con MK-801 tritiado, probando todas estas diferentes condiciones. Este experimento se realizó utilizando algunas secciones de tejido humano, provenientes de dos casos controles. Se añadieron secciones sagitales de tejido neurológico de rata, para comparar las condiciones de conservación de este tejido con las del tejido humano.

Existían por tanto cuatro condiciones del experimento: T1, T2, control 1 (con glutamato 1mM) y control 2 (con MK-801 5 μ M). En total se incluyeron cinco secciones para cada condición, y se experimentó con tres grupos de variables diferentes (es decir, tres protocolos) según el tiempo de lavado y uso del tampón de incubación I o II. De este primer experimento se extrajeron las siguientes conclusiones:

- 1- No existían diferencias apreciables entre los dos tampones de incubación
- 2- La duración ideal de los lavados posteriores a la incubación era de un minuto durante tres veces consecutivas, dado que esta variable proporcionó un lavado homogéneo, sin afectar al estado de conservación del tejido
- 3- El mejor ligando para la medición de la captación inespecífica resultó el MK-801, ya que condicionó los marcajes de fondo de menor intensidad.

PROTOCOLO DEFINITIVO DE LOS EXPERIMENTOS

Atemperación y secado de las secciones

Para poder realizar los experimentos las secciones de tejido deben previamente descongelarse hasta la temperatura ambiente, aproximadamente durante 20 minutos. Para ello las secciones son colocadas en gradillas numeradas, ya dispuestas para la realización posterior de los diferentes baños durante los experimentos.

Pre-incubación

Las secciones de tejido se pre-incubaban en el tampón de incubación tris-acetato 50 mM a pH 7.4, dispuestas en cubetas clasificadas (T1, T2 y control), durante 30 minutos a 4°C.

Incubación

Las secciones se incubaban seguidamente en las tres cubetas correspondientes con el ligando radiactivo (MK-801 tritiado a concentración 5nM) durante 120 minutos a 25°C. En la tercera cubeta se añade MK 801 5 µM frío, para determinar la fijación inespecífica del ligando radioactivo. Esta cubeta será la cubeta control, dado el bloqueo que el MK 801 ejercerá sobre los receptores NMDA de las secciones, compitiendo con el MK-801 tritiado para su unión a dichos receptores.

Lavado

En la misma solución tampón fría a 4°C tres veces, para eliminar el exceso de ligando no unido al receptor presente en el medio y al tejido, y para reducir la fijación no específica. Se realizó un aclarado final con agua destilada, para eliminar las sales de los tejidos y facilitar el secado posterior.

Secado

Se realiza con aire frío y seco a 4 °C durante toda la noche siguiente al experimento, para evitar la disociación del ligando del receptor y su posterior difusión.

Generación de autorradiogramas

Una vez secos y marcados, los portaobjetos con las secciones de tejido se exponen a placas de emulsión fotográfica sensibles al tritio ($[^3\text{H}]$ Hyperfilm Amersham, U.K), juntamente con escalas de patrones de tritio ($[^3\text{H}]$ Microscales, Amersham UK), que contienen concentraciones conocidas de radioactividad. La exposición de los films se realiza siempre a 4°C.

El tiempo de exposición de los filmes fue de 4 o 5 semanas, según el experimento. Pasado este periodo los autorradiogramas se revelaron durante 5 minutos a 18°C con el revelador LX24 (Kodak USA), se fijaron durante 5 minutos en fijador AL4 de Kodak, se lavaron 10 minutos en agua corriente y luego en agua desionizada, y finalmente se dejaron secar.

REGIONES CEREBRALES Y PACIENTES INCLUIDOS

ÁREAS CEREBRALES ESTUDIADAS

Las áreas cerebrales incluidas en los diferentes experimentos fueron las siguientes:

- 1.- Córtex frontal (inicialmente interno y externo)
- 2.- Núcleo estriado (caudado y putamen)
- 3.- Hipocampo
- 4.- Vermis y hemisferio cerebelosos

Las muestras frontales provenientes del Instituto Anatómico Forense siempre correspondían al córtex prefrontal del hemisferio derecho. En las muestras provenientes del banco de Tejidos Neurológicos no se dispuso de la información relativa al área concreta del córtex frontal, manteniéndose la condición de corresponder siempre al hemisferio derecho. Por tanto, en 14 de los pacientes y en 6 de los controles sabemos con seguridad que las muestras son de córtex prefrontal.

ÁREAS Y PACIENTES INCLUIDOS EN LOS DIFERENTES EXPERIMENTOS

Previamente a la macroincubación, en la que se incluyeron muestras de todos los alcohólicos y controles, se realizaron tres experimentos autorradiográficos sobre tejido de parte de la muestra. Estos experimentos permitieron a la doctoranda adquirir la práctica imprescindible en autorradiografía., seleccionar las áreas cerebrales que finalmente se incluirían en la macroincubación, comprobar la viabilidad del tejido congelado, y determinar el mejor tiempo de exposición, que oscilaba entre 4 y 5 semanas.

La determinación de la densidad de unión del ligando [^3H] MK 801 en las muestras de controles y consumidores se realizó en cuatro experimentos independientes. En los dos primeros se utilizaron todas las regiones cerebrales arriba nombradas, en cinco consumidores y cinco controles, con dos tiempos diferentes de exposición (4 semanas en el primero y 5 semanas en el segundo).

En el tercer experimento el estudio se centró ya en cuatro de las cinco áreas, desestimándose la inclusión del núcleo estriado por los bajos resultados en la densidad de

los receptores, y por ser un área sin referencias histológicas conocidas en relación al consumo crónico de alcohol. Se estudiaron las muestras de seis consumidores y seis controles. Se comprobó una vez más la viabilidad del tejido congelado.

Finalmente, en el cuarto experimento se realizó una macroincubación, en la que se incluyeron muestras provenientes de los 16 consumidores de alcohol y de los 16 controles incluidos en el estudio. En este experimento se incluyeron sólo las dos áreas cerebrales especialmente ricas en receptores glutamatérgicos, y que en la literatura se han relacionado con alteraciones clínicas e histológicas provocadas por el abuso de alcohol: córtex frontal e hipocampo.

En el primer capítulo de “Resultados”, se describen brevemente los obtenidos en los tres primeros experimentos, para pasar seguidamente al análisis en profundidad de los datos de la macroincubación.

CUANTIFICACIÓN DE LOS AUTORRADIOGRAMAS

Los autorradiogramas tipo film, una vez revelados, se cuantificaron mediante microdensitometría con el sistema de análisis de imágenes *Microcomputer Imaging Device* (MCID M4, Imaging Research Inc., St. Catharines, Ontario, Canadá) equipado con un transiluminador Northern Light y una cámara de vídeo Sony, situados en el mismo Laboratorio de Neuroquímica del CSIC. Previamente se corrigieron los posibles defectos de iluminación o de cámara. La calibración con patrones de plástico de tritio ($[^3\text{H}]$ Microscales, AMERSHAM, Inglaterra) presentes en cada film permitió la conversión de los valores de densidad óptica de las imágenes a densidades de receptores (nCi/mg de tejido). Los resultados fueron transformados en fmol/mg de proteína asumiendo una concentración homogénea de 0.1 mg de proteína /mg de tejido.

La determinación anatómica de las diversas áreas cerebrales fue designada atendiendo a diversos atlas del SNC. Cada una de las áreas fue subdividida en las siguientes subáreas:

- Córtex frontal: córtex frontal externo (CFe) y córtex frontal interno (CFi)
- Estríado: caudado (Cd) y putamen (Pt)
- Hipocampo: gyrus dentado (DG), hillum (HI) y región CA1
- Vermis: sustancia gris (Vr) y sustancia blanca cerebelosa (SB)
- Hemisferio cerebeloso (Cb)

El análisis fotodensitométrico se realizó sobre cinco puntos diferentes de cada una de las subáreas de cada paciente, en todos los cortes revelados durante los experimentos, tanto los provenientes de pacientes alcohólicos como los de controles. Los resultados obtenidos en los diferentes experimentos autorradiográficos fueron homogéneos y congruentes entre sí, lo que confirmó la correcta estandarización de la técnica autorradiográfica.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La medición de la densidad de cada sección, obtenida mediante la autorradiografía de receptores, se realizó en cinco puntos adyacentes del mismo corte. La media de dichas mediciones fue considerada un dato simple de densidad en un área en una sección de tejido. Dado que cada muestra de tejido de todas las áreas cerebrales estudiadas se expuso al ligando tritiado por duplicado, en secciones pareadas colocadas en portaobjetos diferentes, las parejas de datos obtenidos fueron analizados obteniéndose la media de ambos resultados, que fue la utilizada en los posteriores análisis de resultados.

El análisis estadístico se realizó a través de una base de datos permanente e interactiva para la posterior aplicación de diferentes pruebas de análisis univariado y multivariado mediante el paquete estadístico SPSS 14.0 (SPSS-X Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, Illinois). Se utilizaron las medias y desviaciones estándar para las características basales de los pacientes. Las comparaciones de las densidades de receptores entre grupos se realizaron utilizando el t-test no pareado, dado que las variables mostraron una distribución normal atendiendo a los resultados del test de Kolmogorov-Smirnov. Todos los tests estadísticos fueron 2-tailed, y se asumió el nivel de significación de 0.05.

Para descartar cambios significativos en la densidad de receptores secundarios a variables como la edad, género, tiempo transcurrido entre la defunción y la congelación del tejido (*post-mortem delay*), tiempo de almacenamiento de los tejidos congelados antes de su uso en los experimentos, el consumo de alcohol, la existencia de fibrosis hepática, consumo de benzodiazepinas, tabaquismo y muerte súbita, se realizó un análisis de la covarianza para las tres regiones estudiadas.

RESULTADOS

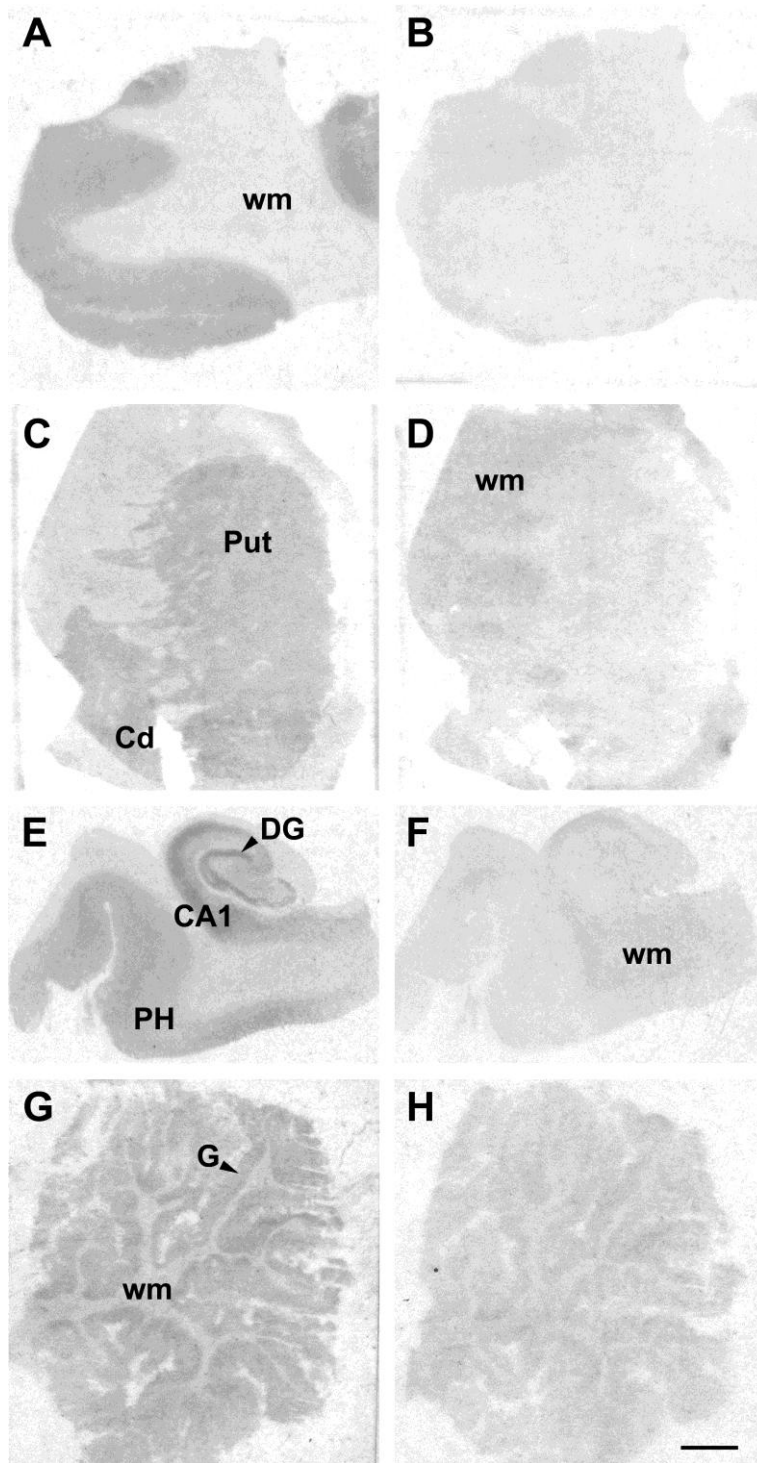
Este capítulo se desglosa en los siguientes apartados:

1. Características clínicas de los controles incluidos en la muestra
2. Características clínicas de los alcohólicos de la muestra
3. Experimentos previos a la macroincubación, realizados con muestras parciales, con el objetivo de adquirir experiencia en autorradiografía, comprobar la viabilidad del tejido, y ajustar las condiciones y variables más adecuadas, de cara a la realización de la macroincubación.

A partir del apartado 4, se reproducen y analizan los resultados obtenidos en la macroincubación. Siguiendo los objetivos del estudio, los resultados se han agrupado para responder a cada uno de las siguientes cuestiones:

1. Distribución y densidad de los receptores NMDA en el SNC de pacientes sin hábito enólico (controles). Comparación con la distribución y densidad de los mismos receptores obtenidos en pacientes consumidores de alcohol
2. Análisis de las posibles diferencias en las densidades de receptores NMDA entre los consumidores de alcohol, atendiendo al mantenimiento o no de la ingesta alcohólica hasta su defunción (alcohólicos no abstinentes y abstinentes)
3. Analizar las posibles diferencias en la densidad de receptores NMDA entre los consumidores crónicos de alcohol según la intensidad de la ingesta habitual, diferenciando entre:
 - consumidores de dosis moderadas de alcohol (40-80g/día)
 - consumidores de dosis altas de alcohol (>80g/día)
4. Estudiar las posibles diferencias en la densidad de receptores entre consumidores de alcohol atribuible a las circunstancias de la defunción, diferenciando dos grupos:
 - Fallecidos por muerte súbita
 - Fallecidos por causas que no condicionaron una muerte súbita

Figura 7. Imágenes autorradiográficas de la unión total del [3H]MK801 en distintas regiones de cerebro humano. (A) Corteza frontal, (C) núcleo caudado y putamen, (E) formación hipocampal, y (G) cerebelo. B, D, F y H muestran el binding inespecífico del [3H]MK801, obtenido al añadir MK801 a una concentración de 10 μ M en el medio de incubación. Abreviaciones: Cd (núcleo caudado); CA1 (capa 1 del hipocampo); DG (giro dentado); G (capa granular del cerebelo); PH (giro parahipocampal); Put (putamen); wm (sustancia blanca). Barra= 4 mm



CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CONTROLES

A continuación se describen las principales características clínicas, la causa de muerte y el tiempo transcurrido desde la defunción hasta la congelación del tejido, correspondientes a los 16 pacientes controles en los diferentes experimentos. Algunas de sus particularidades clínicas se especifican en la tabla 4.

Edad y género

La edad media de los controles estudiados era de 60 años (± 11.47 años), con extremos de 43 y 74 años. Dos de los pacientes eran mujeres.

Características clínicas

Factores de riesgo vascular: Existían antecedentes de tabaquismo en ocho de los pacientes. Ninguno era diabético. Cuatro eran hipertensos.

Antecedentes patológicos: En la autopsia los patólogos no encontraron ningún caso con signos o estigmas de hepatopatía crónica. Tan sólo en uno de los pacientes era conocido el estado de portador del virus de la hepatitis C, sin antecedentes clínicos de descompensación hepática.

Dos de los pacientes recibieron dosis puntuales de benzodiazepinas nocturnas a dosis bajas los días previos a la defunción, como inductoras del sueño. En un caso se realizó tratamiento sedativo con neurolépticos. Dos pacientes consumieron medicación antidepressiva durante los meses previos al fallecimiento.

Tiempo transcurrido entre el fallecimiento y la congelación del tejido cerebral

El tiempo medio transcurrido entre el fallecimiento y la congelación del tejido cerebral (*post-mortem delay*) fue de 16.5 horas (± 5.2), oscilando entre las 6 y las 23.5 horas en dos casos.

Estudio anatomopatológico

No se observó atrofia macroscópica en el encéfalo de los controles, a criterio del patólogo responsable. Así mismo, el estudio histológico realizado a los pacientes no objetivó alteraciones sugestivas de patologías criterio de exclusión del estudio.

Tabla 4. Edad (años), género (Sx), tiempo entre fallecimiento y congelación de muestras de tejido (PM), causa de muerte (C. muerte) y principales antecedentes patológicos de los pacientes controles incluidos en el estudio

<u>Caso</u>	<u>Edad</u>	<u>Sx</u>	<u>PM</u>	<u>C. muerte</u>	<u>Antecedentes</u>
C1	45	H	23.5	Politraumatismo	-
C2	43	H	23.5	IAM	-
C3	69	H	13	Asfixia	-
C4	74	H	13.5	TEP	Cardiopatía isquémica
C5	67	H	9.5	IAM	-
C6	47	H	16	IAM	Virus C + HTA
C7	59	H	6	IRA	Fibrosis pulmonar
C8	43	F	20	Adenocarcinoma	-
C9	65	H	15	Diseccción Ao	Aneurisma aórtico
C10	74	H	16	EAP	Cardiopatía isquémica
C11	47	H	16	IAM	-
C12	72	H	20	IAM	-
C13	66	F	22	EAP	HTA
C14	59	H	12	EAP	Cardiopatía isquémica
C15	62	H	22	EAP	Cardiopatía isquémica
C16	72	H	19	IAM	-

Diseccción Ao: Diseccción aórtica. IAM: Infarto agudo de miocardio
EAP: Edema agudo de pulmón. IRA: Insuficiencia respiratoria aguda
HTA: Hipertensión arterial. TEP: Tromboembolismo pulmonar

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS CONSUMIDORES DE ALCOHOL

Edad y género

La edad media de los alcohólicos estudiados era de 58 años ($DS \pm 12$ años), con extremos de 34 y 74 años. Todos los pacientes eran varones.

Consumo de alcohol

De los 16 pacientes, 12 consumieron más de 80 gramos de alcohol puro al día durante un periodo mínimo de 10 años. 4 pacientes consumieron durante como mínimo ese periodo de tiempo cantidades moderadas de etanol, entre 40 y 80 gramos al día, de forma regular.

En cuatro de los consumidores de alcohol de más de 80g/día el consumo había cesado durante un tiempo superior a una semana antes de su defunción, oscilando dicho período entre una semana y varios meses, por lo que fueron considerados consumidores abstinentes. Las circunstancias de su abstinencia de alcohol fueron las siguientes:

- Uno dejó de consumir alcohol aproximadamente 3 semanas antes de su muerte (acaecida por muerte súbita)
- El segundo se mantuvo abstinentes los últimos 4 meses de su vida
- El tercero durante su último año de vida.
- El cuarto falleció tras una semana de ingreso hospitalario, por lo que durante la misma no consumió alcohol.

Las cantidades diarias aproximadas de alcohol puro consumidas por cada uno de los pacientes, y su identificación o no como abstinentes, se detallan en la tabla 5.

Dado que ningún consumidor fue diagnosticado en vida de enfermedades relacionadas con el consumo de alcohol, en ningún caso se cumplieron criterios de dependencia alcohólica según el DSM-IV o de enfermedades asociadas al alcoholismo según el ICD-10.

Características clínicas

Factores de riesgo vascular: Existían antecedentes de tabaquismo en 12 de los pacientes. Dos casos eran diabéticos, uno insulino dependiente. Dos pacientes, no diabéticos, eran conocidos hipertensos.

Antecedentes patológicos: En la autopsia se detectó en tres pacientes un hígado macroscópicamente compatible con hepatopatía crónica, sin antecedentes de descompensación. En uno sólo de los casos el paciente era conocido portador del virus de la hepatitis B.

Dos pacientes recibieron dosis puntuales de benzodiazepinas durante los días previos a la defunción.

Algunas de sus particularidades clínicas y la causa de muerte se detallan en la tabla 6.

Tiempo medio transcurrido entre el fallecimiento y la congelación del tejido

El tiempo medio transcurrido entre la muerte y la congelación del tejido neurológico (*post-mortem delay*) fue de 19.2 horas (± 7.8), oscilando entre las 5.5 y las 28 horas.

Estudio anatómopatológico

No se observó atrofia macroscópica en el encéfalo de los alcohólicos, a criterio del patólogo responsable. Así mismo, el estudio histológico realizado no objetivó alteraciones sugestivas de patologías que fueran criterio de exclusión del estudio.

<u>Alcohólicos</u>	<u>Dosis</u>	<u>Abstinencia</u>
A1	40-80	NO
A2	>80	NO
A3	>80	SI
A4	>80	SI
A5	>80	NO
A6	40-80	NO
A7	>80	NO
A8	>80	NO
A9	>80	NO
A10	40-80	NO
A11	40-80	NO
A12	>80	NO
A13	>80	NO
A14	>80	SI
A15	>80	NO
A16	>80	SI

Tabla 5. Dosis habituales de alcohol puro consumidas (g/día) por los pacientes alcohólicos incluidos en el estudio. La tercera columna diferencia los alcohólicos con abstinencia pre-mortem superior a 48 horas.

Tabla 6. Edad (años), género (Sx), tiempo entre fallecimiento y congelación de muestras de tejido (PM), causa de muerte (C. muerte) y principales antecedentes patológicos de los pacientes alcohólicos incluidos en el estudio

<u>N</u>	<u>Edad</u>	<u>Sx</u>	<u>PM</u>	<u>C. muerte</u>	<u>Antecedentes</u>
A1	49	M	5,5	Shock hipovolémico	-
A2	57	M	27	Hemoptisis	Tuberculosis
A3	44	M	21	IRA	Neumopatía exTP
A4	67	M	16	IRA	CH (necrop.)
A5	50	M	28	Muerte súbita	-
A6	66	M	23	Muerte súbita	Diabetes mellitus
A7	34	M	28	IRA (pleuropericarditis)	-
A8	43	M	24	IRA	-
A9	66	M	11	Politraumatismo	Diabetes mellitus
A10	72	M	20	IAM	HTA
A11	74	M	24,5	Muerte súbita	VB+. CH (necro)
A12	51	M	21,5	Muerte súbita	-
A13	63	M	28	Muerte súbita	Cardiop. isquémica
A14	56	M	10	EAP	CH (necro)
A15	73	M	14	HDA	Neumopatía crónica
A16	64	M	6	Rotura aneurisma Ao	-

CH: Cirrosis hepática. TEP: Tromboembolismo pulmonar

EAP: Edema agudo de pulmón. IAM: Infarto agudo de miocardio

HDA: Hemorragia digestiva alta. IRA: Insuficiencia respiratoria aguda

HTA: Hipertensión arterial. Neumopatía Ext.: N.crónica post-tuberculosis

EXPERIMENTOS PREVIOS A LA MACROINCUBACIÓN

EXPERIMENTOS SOBRE CÓRTEX FRONTAL, NÚCLEO ESTRIADO, HIPOCAMPO Y CEREBELO (EXPERIMENTOS 1 Y 2)

Como se ha descrito en páginas anteriores, se realizaron dos experimentos independientes con las secciones histológicas de los tejidos procedentes de 5 alcohólicos y 5 controles, bajo las mismas condiciones experimentales excepto en el tiempo de exposición sobre los autorradiogramas (4 y 5 semanas respectivamente).

No se detectaron diferencias significativas asociadas al mayor o menor tiempo de exposición; fue escogido aleatoriamente para la posterior macroincubación el de 5 semanas.

En ninguna de las áreas estudiadas se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos. En las tablas 7-9 se detallan los resultados comparativos entre controles y alcohólicos en el segundo experimento, con 5 semanas de exposición.

Como era esperable, se comprobó que, de todas las áreas a estudio incluidas en estos experimentos, las dos más ricas en receptores NMDA eran el hipocampo y córtex frontal. Esta característica, unida a la conocida influencia del consumo de alcohol en las mismas, determinó que para la macroincubación se desestimaran las restantes regiones (cerebelo y núcleo estriado).

EXPERIMENTO SOBRE CÓRTEX FRONTAL, HIPOCAMPO Y CEREBELO (EXPERIMENTO 3)

Posteriormente se realizó un tercer experimento, con tejido de otros 5 consumidores de alcohol y 5 controles, bajo las mismas condiciones experimentales, y un tiempo de exposición sobre los autorradiogramas de 5 semanas.

El estudio del núcleo estriado fue desestimado, para focalizar el análisis de los resultados obtenidos en regiones claramente asociadas a alteraciones estructurales en relación al consumo de alcohol (córtex frontal, hipocampo y cerebelo). Otra diferencia en el planteamiento del experimento, en relación a los dos anteriores, fue que los resultados obtenidos en el córtex frontal se describen y analizan sin desglosarse en córtex interno y externo, dada la ausencia de significación estadística obtenida en los dos primeros experimentos entre ambas subáreas.

En las tablas 10 a 12 se describen los resultados obtenidos.

Tablas 7. Experimento 2. Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en las distintas regiones de cerebro humano de controles(C) (5 semanas de exposición)

CONTROLES	C1	C2	C3	C4	C5	PROM.	DS
FxCxe	76,75	108,00	78,79	62,92	87,24	82,74	7,42
FxCxi	68,78	91,23	69,25	44,90	66,77	68,19	7,34
Cd	58,52	52,12	41,81	46,87	31,16	46,10	4,65
Put	-	56,12	-	48,50	30,24	45,09	7,78
DG	126,62	148,75	142,50	123,01	141,67	136,51	4,96
Hil	82,39	119,51	80,25	72,57	89,15	90,58	8,34
CA1	136,73	186,15	182,03	160,41	185,20	170,10	9,58
Ver	23,31	15,85	17,63	-	27,93	21,68	2,92
Cb	29,61	21,70	11,85	-	13,84	19,25	4,06
WCb	3,75	1,23	1,10	-	11,32	3,74	2,73

PROM: promedio

DS: Desviación estándar

Tabla 8. Experimento 2. Densidad de los receptores NMDA, en fmol por mg de tejido, en las distintas regiones de cerebro humano de consumidores de alcohol (A) (5 semanas de exposición)

ALCOHÓLICOS	A1	A2	A3	A4	A5	PROM.	DS
FxCxe	85,32	43,12	77,14	72,47	89,57	73,52	8,17
FxCxi	73,24	47,12	61,83	62,32	62,37	61,38	4,16
Cd	59,21	36,67	42,66	41,11	33,80	42,69	4,42
Put	61,41	51,32	41,64	-	-	51,46	5,71
DG	134,12	110,86	161,65	151,61	165,10	144,67	10,02
Hil	58,64	92,01	127,19	92,76	72,06	88,53	11,60
CA1	169,72	152,16	182,57	175,05	178,05	171,51	5,27
Ver	17,82	32,39	18,01	16,86	12,37	19,49	3,38
Cb	20,62	32,46	3,97	23,30	9,87	17,85	4,89
WCb	9,34	1,09	5,27	9,43	17,76	1,07	5,07

PROM: promedio

DS: Desviación estándar

Tabla 9. Experimento 2. Comparación entre densidad de los receptores NMDA en distintas regiones de cerebro humano de consumidores de alcohol y controles

ÁREAS	ALCOHÓLICOS	CONTROLES	P
FxCxe	73,52	82,74	0,213
FxCxi	61,38	68,19	0,221
Cd	42,69	46,10	0,304
Put	51,46	45,09	0,272
DG	144,67	136,51	0,243
Hil	88,53	90,58	0,444
CA1	171,51	170,10	0,450
Ver	19,49	21,68	0,324
Cb	17,85	19,25	0,418
WCb	1,07	3,74	0,340

Tabla 10. Experimento 3. Densidad en fmol por mg de tejido de NMDA en controles

CONTROLES	C1	C2	C3	C4	C5	PROM.	DS
Cx Frontal	120,21	114,15	116,08	82,87	81,47	102,96	9,72
CA1	300,77	323,93	286,86	138,16	114,64	232,87	37,27
DG	258,77	234,46	253,01	176,63	97,84	204,15	25,66
Ver	-	46,19	33,42	32,1	47,56	39,86	3,52
Cb	-	39,41	29,45	41,15	44,75	38,69	4,63

PROM: promedio

DS: Desviación estándar

Tabla 11. Experimento 3. Densidad de los receptores NMDA en alcohólicos

CONSUMIDORES	A1	A2	A3	A4	A5	PROM.	DS
Cx Frontal	121,99	105,19	100,14	133,08	117,57	111,59	10,42
CA1	314,10	320,55	123,92	-	210,04	242,55	36,50
DG	212,35	224,61	135,58	-	215,84	197,95	16,26
Ver	32,36	34,70	38,47	50,58	44,00	40,023	5,76
Cb	33,43	35,52	45,22	22,21	21,24	31,53	3,71

Tabla 12. Experimento 3. Análisis comparativo de la densidad de receptores NMDA entre alcohólicos y controles

ÁREAS	ALCOHÓLICOS	CONTROLES	P
Cx Frontal	111,59	102,96	<i>0,41</i>
CA1	242,55	232,87	<i>0,47</i>
DG	197,95	204,15	<i>0,37</i>
Ver	40,023	39,86	<i>0,18</i>
Cb	31,53	38,69	<i>0,26</i>

PROM: promedio DS: Desviación estándar

MACROINCUBACIÓN. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS DENSIDADES DE RECEPTORES NMDA EN CÓRTEX FRONTAL E HIPOCAMPO

Los diferentes apartados de análisis son los siguientes:

1. Objetivo 1. Estudio comparativo de los resultados obtenidos entre la muestra total de pacientes consumidores de alcohol y los pacientes controles
2. Objetivo 2. Estudio comparativo entre consumidores no abstinentes de etanol y consumidores de etanol abstinentes
3. Objetivo 3. Estudio comparativo entre consumidores de dosis altas (más de 80 g/día) y moderadas de alcohol (40-80 g/día)
4. Objetivo 4. Estudio comparativo entre consumidores de alcohol fallecidos por muerte súbita y aquellos fallecidos por causas diferentes a la muerte súbita

ESTUDIO ESTADÍSTICO

Mediante el test Kolmogorov-Smirnov se objetivó que los datos mostraban una distribución normal, por lo que posteriormente se realizó un análisis estadístico (t-test no pareado), expresándose los resultados en valores promedio \pm desviación estándar.

Se observó que el sujeto consumidor de alcohol A13 tenía resultados más de dos desviaciones estándar que la media en el córtex frontal. En consecuencia, se realizó paralelamente un análisis estadístico con 15 consumidores y 16 controles. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares tras este nuevo cálculo, por lo que finalmente se exponen los resultados con 16 consumidores en las páginas siguientes.

Por otra parte, se realizó un análisis de la covarianza incluyendo los datos de edad, género, tiempo transcurrido desde la muerte hasta la congelación de la muestra cerebral, tiempo de almacenamiento del tejido una vez congelado hasta su utilización en el experimento, el diagnóstico necrópsico de fibrosis hepática, el consumo de benzodiazepinas, historia de tabaquismo, antecedentes de muerte súbita y las densidades de receptores obtenidas en el experimento. Tan sólo el dato de la muerte súbita (según el concepto clásico de muerte sin pródromos sin diagnóstico anatomopatológico tras la autopsia) afectó a los resultados estadísticos, aunque de forma no utilizable para conclusiones dada la pequeñez de la muestra.

**OBJETIVO 1. COMPARACIÓN ENTRE EL TOTAL DE ALCOHÓLICOS Y
CONTROLES**

CONTROLES	Fijación de [³ H]MK 801 (fmol/mg de tejido)		
	CF	CA1	GD
C1	69,56	194,56	150,35
C2	85,87	264,12	197,09
C3	92,02	216,29	172,09
C4	79,71	184,05	174,99
C5	87,31	224,26	181,87
C6	42,03	85,87	71,74
C7	55,43	125,36	118,11
C8	50,72	134,41	132,24
C9	67,39	90,21	115,94
C10	100,36	194,92	190,93
C11	89,13	201,08	121,73
C12	57,97	-	-
C13	80,79	167,39	140,57
C14	52,53	204,7	183,32
C15	83,69	157,6	132,24
C16	51,81	153,25	134,05

Tabla 13. Resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK 801 tritiado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de todos los pacientes controles (C) incluidos en el estudio

ALCOHÓLICOS	fijación de [³ H]MK 801 (fmol/mg de tejido)		
	CF	CA1	GD
A1	136,22	219,55	178,25
A2	98,55	286,22	151,80
A3	75,36	214,12	142,02
A4	84,05	177,16	114,12
A5	78,26	-	-
A6	73,18	213,03	188,03
A7	92,39	324,62	162,31
A8	90,21	228,25	158,32
A9	109,05	223,18	196,00
A10	67,39	-	-
A11	74,63	-	-
A12	57,97	80,79	64,13
A13	9,78	111,59	102,89
A14	55,07	128,98	93,47
A15	79,71	160,14	138,40
A16	72,10	123,91	120,65

Tabla 14. Resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK801 tritado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de todos los pacientes consumidores de alcohol (A) incluidos en el estudio

Resultados de los controles

En todos ellos pudo analizarse el tejido proveniente del córtex. El BTN no pudo suministrar tejido hipocampal en uno de los casos.

La edad media de los controles fue de 60 años (± 11.5 DS). El tiempo medio transcurrido entre fallecimiento y congelación de las muestras de tejido fue de 16.5 horas (± 5.3 DS).

Resultados de los consumidores de alcohol

Se obtuvieron autorradiografías nítidas de 13 de los 16 pacientes consumidores, de las que pudo analizarse el tejido proveniente del hipocampo.

La edad media de los pacientes fue 58.1 años (± 11.9 DS). El tiempo medio transcurrido entre fallecimiento y congelación de las muestras de tejido fue de 19.2 horas (± 7.6 DS).

Resultados comparativos entre controles y el total de alcohólicos

Como puede observarse en esta tabla, **no se detectaron diferencias significativas** entre consumidores de alcohol y controles, en ninguna de las áreas estudiadas.

ÁREAS	CONTROLES	DS	ALCOHÓLICOS	DS	p
Córtex frontal	71,57 (42,03-100,36)	4,47	78,26 (55,07-136,22)	6,74	<i>0,21</i>
CA1	173,04 (85,87-264,12)	12,81	191,5 (80,79-324,62)	19,44	<i>0,21</i>
GD	147,71 (71,74-197,09)	9,01	139,15 (64,13-196)	10,80	<i>0,27</i>

Tabla 15. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritado a los receptores NMDA en pacientes bebedores y controles en las tres áreas cerebrales indicadas. DS: Desviación estándar. En paréntesis, el rango correspondiente a cada apartado.

OBJETIVO 2. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CONSUMIDORES DE ETANOL NO ABSTINENTES Y ABSTINENTES

Otra variable analizada en nuestro estudio fue la abstinencia de alcohol durante los días previos a la defunción del paciente. El tiempo mínimo transcurrido desde el abandono del consumo hasta el óbito fue de una semana.

Como puede observarse en las tablas siguientes, **no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de consumidores**. Los consumidores no abstinentes no poseían densidades de receptores NMDA significativamente mayores que los controles, ni que los consumidores abstinentes.

Pacientes consumidores no abstinentes

<u>No abstinentes</u>	<u>Dosis</u>	<u>CF</u>	<u>CA1</u>	<u>GD</u>
A1	40-80	136,22	219,55	178,25
A2	>80	98,55	286,22	151,80
A5	>80	78,26	-	-
A6	40-80	73,18	213,03	188,03
A7	>80	92,39	324,62	162,31
A8	>80	90,21	228,25	158,32
A9	>80	109,05	223,18	196,00
A10	40-80	67,39	-	-
A11	40-80	74,63	-	-
A12	>80	57,97	80,79	64,13
A13	>80	9,78	111,59	102,89
A15	>80	79,71	160,14	138,40

Tabla 16. Dosis de etanol diaria (en g/día) y resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK 801 tritado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de los pacientes alcohólicos no abstinentes incluidos en el estudio

Pacientes consumidores abstinentes

<u>Abstinentes</u>	<u>Dosis</u>	<u>CF</u>	<u>CA1</u>	<u>GD</u>
A3	>80	75,36	214,12	142,02
A4	>80	84,05	177,16	114,12
A14	>80	55,07	128,98	93,47
A16	>80	72,10	123,91	120,65

Tabla 17. Dosis de etanol diaria (en g/día) y resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK 801 tritiado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de los pacientes consumidores abstinentes incluidos en el estudio

Estudio comparativo entre consumidores abstinentes y no abstinentes

<u>ÁREAS</u>	<u>No abst.</u>	<u>n</u>	<u>DS</u>	<u>Abst</u>	<u>n</u>	<u>DS</u>	<u>P</u>
Córtex frontal	83,62	12	6,64	62,26	4	17,59	<i>0,089</i>
CA1	203,01	9	26,26	165,43	4	21,29	<i>0,198</i>
GD	145,88	9	14,83	124,17	4	9,48	<i>0,190</i>

Tabla 18. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores no abstinentes (No abst.) y bebedores abstinentes (Abst.), en las tres áreas cerebrales indicadas. DS: Desviación estándar

Estudio comparativo entre consumidores no abstinentes y controles

ÁREAS	No abst.	n	DS	C	n	DS	P
Córtex frontal	83,62	12	6,64	71,68	16	4,47	<i>0,065</i>
CA1	203,01	9	26,26	173,04	15	12,81	<i>0,131</i>
GD	145,88	9	14,84	147,71	15	9,01	<i>0,454</i>

Tabla 19. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores no abstinentes (No abst.) y pacientes controles (C), en las tres áreas cerebrales indicadas. DS. Desviación estándar

Estudio comparativo entre alcohólicos abstinentes y controles

ÁREAS	Abst.	n	DS	C	n	DS	P
Córtex frontal	62,26	4	17,59	71,68	16	4,47	<i>0,227</i>
CA1	165,43	4	21,29	173,04	15	12,81	<i>0,394</i>
GD	124,17	4	9,48	147,71	15	9,01	<i>0,109</i>

Tabla 20. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores abstinentes (Abst.) y pacientes controles (C), en las tres áreas cerebrales indicadas

OBJETIVO 3. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CONSUMIDORES DE ALCOHOL AGRUPADOS SEGÚN LA DOSIS DIARIA DE ETANOL, Y CONTROLES

En ninguna de las tres áreas cerebrales la diferencia entre alcohólicos consumidores de más de 80g/día y consumidores de dosis moderadas alcanzó la significación estadística (tabla 23). Los resultados no se vieron modificados con la exclusión de los dos casos con resultados extremos (datos no incluidos en la tabla). Igualmente, en las tablas 24 y 25 se describen los resultados comparativos entre ambos grupos de alcohólicos y controles. **No se detectaron diferencias** entre ambos grupos.

Pacientes consumidores de dosis altas de alcohol

<u>Consumidores</u>	<u>Dosis</u>	<u>CF</u>	<u>CA1</u>	<u>GD</u>	<u>Abstinencia</u>
A2	>80	98,55	286,22	151,80	NO
A3	>80	75,36	214,12	142,02	SI
A4	>80	84,05	177,16	114,12	SI
A5	>80	78,26	-	-	NO
A7	>80	92,39	324,62	162,31	NO
A8	>80	90,21	228,25	158,32	NO
A9	>80	109,05	223,18	196,00	NO
A12	>80	57,97	80,79	64,13	NO
A13	>80	9,78	111,59	102,89	NO
A14	>80	55,07	128,98	93,47	SI
A15	>80	79,71	160,14	138,40	NO
A16	>80	72,10	123,91	120,65	SI

Tabla 21. Dosis de etanol diaria (en g/día) y resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK 801 tritiado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de los pacientes consumidores de dosis altas de alcohol

12 de los 16 pacientes consumidores de alcohol habían consumido cantidades regulares de alcohol iguales o superiores a 80 g/día, durante un mínimo de 10 años. Todos eran varones. La edad media de los pacientes era de 55.7 años (\pm 11.6 DS). 4 eran abstinentes (abandono de la ingesta de alcohol un mínimo de una semana antes de su defunción).

Pacientes consumidores de dosis moderadas de alcohol

4 pacientes consumieron entre 40 y 80 g/día de etanol regularmente, durante un período mínimo de 10 años. Ninguno era abstinentes.

<u>Consumidores</u>	<u>Dosis</u>	<u>CF</u>	<u>CA1</u>	<u>GD</u>	<u>Abstinencia</u>
A1	40-80	136,22	219,55	178,25	NO
A6	40-80	73,18	213,03	188,03	NO
A10	40-80	67,39	-	-	NO
A11	40-80	74,63	-	-	NO

Tabla 22. Dosis de etanol diaria (en g/día) y resultados (en fmol/mg de tejido) de la fijación de [³H]MK 801 tritiado a los receptores NMDA en córtex frontal (CF), gyrus dentatus (GD) y CA1 hipocampal de los pacientes consumidores de dosis moderadas de alcohol

Análisis comparativo

<u>ÁREA</u>	<u>D.M.</u>	<u>n</u>	<u>DS</u>	<u>D.A.</u>	<u>n</u>	<u>DS</u>	<u>P</u>
Córtex frontal	87,6	4	16,14	75,3	12	7,44	0,22
CA1	215,75	2	3,37	187,15	11	22,87	0,31
GD	182.81	2	4,94	131.05	11	11,13	0,05

Tabla 23. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores de mas de 80g día de etanol (D.A.) y bebedores de dosis moderadas (D.M.) en las tres áreas cerebrales indicadas. DS: Desviación estándar

ÁREA	CONTROLES	n	DS	D.A.	n	DS	P
Córtex frontal	71,68	16	4,47	75,3	12	7,44	0,27
CA1	173.04	15	12,81	187,15	11	22,87	0,33
GD	147,7	15	9,01	131.05	11	11,13	0,26

Tabla 24. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes bebedores de mas de 80g día de etanol (D.A.) y controles en las tres áreas cerebrales indicada. DS: Desviación estándar

ÁREAS	D.M.	n	DS	CONTROLES	n	DS	p
Córtex frontal	87,6	4	16,14	71,68	16	4,47	0,09
CA1	215,75	2	3,37	173.04	15	12,81	0,13
GD	182.81	2	4,94	147,7	15	9,01	0,09

Tabla 25. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de la media obtenida de la medición de la unión específica del MK-801 tritiado a los receptores NMDA en pacientes consumidores de dosis moderadas de alcohol (DM), y controles (C), en las tres áreas cerebrales indicadas. DS: Desviación estándar

OBJETIVO 4. COMPARACIÓN ENTRE CONSUMIDORES DE ALCOHOL FALLECIDOS POR MUERTE SÚBITA Y POR CAUSAS DIFERENTES A LA MUERTE SÚBITA

Un grupo de investigadores (Piggott et al 1992) denominaron muerte súbita a aquella circunstancia de defunción acaecida de forma aguda sin enfermedad diagnosticada los días previos. En el mismo trabajo publicaron resultados que los llevaron a sugerir que la forma de morir del paciente, el llamado “estado agónico”, afectaba a la capacidad de unión del MK-801 tritiado al córtex cerebral humano., aumentando la densidad de unión de los NMDA al MK-801 en caso de muerte súbita.

Por este motivo, en nuestro estudio se incluyó el análisis comparativo de la densidad de receptores NMDA entre consumidores de alcohol fallecidos por muerte súbita, tanto bajo el concepto clásico de muerte sin manifestaciones premórbidas y de causa no evidenciada tras autopsia (datos no incluidos en las tablas, relativos a 5 pacientes) como según la definición de Piggott, y consumidores de alcohol fallecidos por causas diferentes a la muerte súbita.

No se detectaron diferencias entre consumidores de alcohol fallecidos por muerte súbita y fallecidos por otras causas diferentes, tal y como se detalla en la tabla 27. Al realizar el estudio de covarianza el dato de la muerte súbita según el concepto clásico (5 pacientes) esta variable sí afectó a los resultados estadísticos, aunque dada la pequeñez de la muestra no resulta adecuado realizar conclusiones.

Pacientes fallecidos por muerte súbita

En 13 de los consumidores de alcohol la causa de la defunción fue una muerte súbita, según el concepto descrito por Piggott (Piggott et al., 1992). En el caso de las muestras hipocampales, pudo analizarse en 10 de los casos, por no disponer en tres de los casos del tejido en cuestión. Las características clínicas más relevantes se desglosan en la tabla 27. La edad promedio de los pacientes era de 57.3 años (± 10.2 DS).

Pacientes consumidores de alcohol fallecidos por muerte no súbita

Este grupo estaba formado por tres pacientes, con una edad promedio de 61.3 años (± 12.3 DS). Todos consumían dosis altas de alcohol. Tres eran abstinentes.

<u>M. súbita</u>	<u>Dosis</u>	<u>C. muerte</u>	<u>Edad</u>	<u>Abstinentes</u>
A1	40-80	Shock hipovolémico	49	NO
A2	>80	Hemoptisis	57	NO
A5	>80	Muerte súbita	50	NO
A6	40-80	Muerte súbita	66	NO
A7	>80	IRA (pleuropericarditis)	34	NO
A8	>80	IRA	43	NO
A9	>80	Politraumatismo	66	NO
A10	40-80	IAM	72	NO
A11	40-80	Muerte súbita	74	NO
A12	>80	Muerte súbita	51	NO
A13	>80	Muerte súbita	63	NO
A14	>80	EAP	56	SI
A16	>80	Rotura aneurisma Ao	64	SI

Tabla 26. Edad, dosis media de alcohol puro al día, causa de muerte y situación de abstinencia o no de los alcohólicos fallecidos pr muerte súbita (según criterios de Piggot)

ÁREA	MS	DS	NO MS	DS	p
n	13		3		
Córtex frontal	77,94	8,34	79,75	2,49	<i>0,46</i>
CA1	193,85	25,21	183,68	15,89	<i>0,42</i>
GD	141,54	13,95	131,44	8,75	<i>0,36</i>

Tabla 27. Resultados comparativos, en fmol por mg de tejido, de los receptores NMDA en pacientes consumidores de alcohol fallecidos por muerte súbita (MS) y pacientes consumidores de alcohol fallecidos por causas diversas diferentes de la muerte súbita (NO MS)

DISCUSIÓN

El glutamato forma parte de los llamados aminoácidos excitadores (AAE) (glutamato, aspartato y otros compuestos relacionados), que son los principales neurotransmisores excitadores del SNC de los mamíferos. Están presentes en la gran mayoría de sinapsis, en las que desempeñan un papel fundamental en muchas de sus funciones. De hecho la mayor parte de las vías excitadoras del SNC son de naturaleza glutamatérgica, en particular las fibras de origen cortical que inervan las estructuras subcorticales, así como las fibras córtico-corticales y de los sistemas sensoriales. Tienen especial relevancia en el hipocampo, la corteza cerebral, el estriado, el cerebelo y la médula espinal. Las neuronas y las células gliales comparten los mismos tipos de receptores de glutamato, excepto los NMDA, que están ausentes en la glía. El glutamato es probablemente el principal excitador glial y la forma más prevalente de señalización neurona-glía. De entre los AAE, el glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC. La regulación dinámica de la eficacia de la transmisión sináptica excitatoria es crítica para la plasticidad neuronal y la remodelación de las conexiones neuronales.

Los receptores NMDA del glutamato poseen unas características particulares que condicionan sus funciones:

1. Poseen una propiedad única: Su activación es voltaje-dependiente, como resultado del bloqueo del canal iónico del receptor por los iones de Mg^{2+} extracelulares
2. El flujo dependiente del voltaje de Na^+ y Ca^{2+} dentro del receptor NMDA convierte a éste en el mecanismo molecular fundamental para controlar la plasticidad sináptica
3. El influjo de Ca^{2+} a través del canal del receptor NMDA resulta crítico en la plasticidad tanto pre como post-sinápticas, mecanismos celulares para el aprendizaje y la memoria
4. Los complejos NMDA formados por la asociación de las subunidades NR1/NR2C y NR1/NR2D son mucho menos sensibles al bloqueo ejercido por el Mg^{2+} que los complejos formados por NR1/NR2A y NR1/NR2B, indicando que la sensibilidad al bloqueo del voltaje endógeno depende directamente de la composición de las subunidades del receptor

5. El receptor NMDA está íntimamente relacionado con la plasticidad cerebral, que es la habilidad del cerebro para cambiar en relación a estímulos externos, tanto durante el aprendizaje como los almacenados en la memoria
6. El receptor NMDA es fundamental en el refuerzo de las sinapsis y la diferenciación neuronal, a través de la Potenciación a Largo Plazo (PLP), y de la debilitación de las sinapsis a través de la Depresión a Largo Plazo (DLP), y está implicado en las funciones de aprendizaje y memoria
7. Las funciones de los receptores NMDA se interrelacionan con las de otros receptores glutamatérgicos, los AMPA, que utilizan el calcio que entra en sus canales como segundo mensajero

A pesar de la gran cantidad de estudios desarrollados en las pasadas décadas sobre los efectos del alcohol en el cerebro humano, nuestros conocimientos sobre cómo el cerebro modifica su estructura y función en respuesta a la exposición al alcohol siguen siendo insuficientes. El alcohol puede alterar la función y estructura del cerebro, tanto en desarrollo como adulto, causando múltiples patologías (deterioro cognitivo, convulsiones, déficits mnésicos...). Numerosos estudios han demostrado que en el cerebro maduro, la exposición crónica al alcohol puede causar enfermedades debilitantes severas de los sistemas nerviosos central y periférico, y del sistema muscular esquelético. La consecuencia más común del abuso continuado de alcohol es la pérdida desproporcionada de sustancia blanca cerebral y alteraciones en la función ejecutiva cerebral. El cerebelo (especialmente el vermis), los circuitos cortico-límbicos, el sistema muscular esquelético y los nervios periféricos se ven también frecuentemente afectados en el alcoholismo crónico. Aunque todos los tipos de células dentro del sistema nervioso son vulnerables a los efectos tóxicos, metabólicos y degenerativos de alcohol, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células terminales sinápticas son los más afectados, ocasionando la atrofia de la sustancia blanca, la neuritis y el deterioro de la sinaptogénesis. Por otra parte, además de la neuropatología degenerativa crónica, los alcohólicos corren el riesgo de padecer lesiones hemorrágicas agudas y subagudas, potencialmente muy graves e incluso mortales, en el diencefalo y el tronco cerebral debido a la deficiencia de tiamina, que ejerce efectos tóxicos y metabólicos en la glía, la mielina y la microvasculatura. Además, el alcohol también tiene efectos neurotóxicos y teratogénicos devastadores sobre el desarrollo del cerebro durante el desarrollo fetal (síndrome alcohólico fetal).

Al igual que en otras drogas de abuso, los cambios neuroadaptativos inducidos por la exposición al alcohol se han relacionado con la alteración de los sistemas de señales intercelulares, de la transcripción genética, de la traslación, y de la expresión proteica a nivel celular. Recientemente se ha sugerido que el alcoholismo y las enfermedades relacionadas con el alcohol son el resultado de una compleja interacción de múltiples factores genéticos y ambientales. Por una parte existe una carga genética individual que facilita el desarrollo del alcoholismo, y además la alteración epigenética provocada por el etanol puede a su vez contribuir a la propia patología y a la sensibilidad al tóxico.

La regulación dinámica de la transmisión sináptica excitatoria es crítica para la plasticidad neuronal basada en la experiencia y para la remodelación de las conexiones neuronales. Una de las más importantes líneas de investigación sobre la relación etanol-cerebro desarrolladas durante las últimas décadas es la que corresponde a la hipótesis glutamatérgica (tabla Tsai). Está bien establecido que los receptores NMDA están implicados en fenotipos asociados al alcoholismo como la tolerancia, dependencia, abstinencia, anhelo (*craving*) y recaídas en el consumo (Pignataro et al 2009). La entrada del Ca^{2+} dentro de la post-sinapsis a través del canal de los receptores NMDA permite la activación de enzimas calcio-dependientes, que conduce a cambios a largo plazo en el espacio sináptico y otras modificaciones celulares. Los efectos inhibitorios del etanol sobre la actividad del canal se han objetivado mediante la medición de los potenciales excitatorios post-sinápticos en cortes de muchas regiones cerebrales como el hipocampo, córtex, amígdala, núcleo accumbens y dorsal estriado (Kolb et al 2005). Posteriormente otros estudios han demostrado que las subunidades del receptor NMDA poseen diferente sensibilidad al etanol, y que la sensibilidad individual de un receptor NMDA individual depende de las combinaciones específicas de sus subunidades NR1 y NR2.

Existe una clara predisposición genética al alcoholismo (ver Introducción) en la que está implicado el sistema glutamatérgico, con polimorfismos de genes responsables de la síntesis de proteínas receptoras, y cuya presencia en la genética del individuo se asocia al alcoholismo, al inicio precoz del hábito alcohólico y/o al mayor padecimiento de complicaciones graves durante la abstinencia de alcohol (Wernicke et al 2003). A su vez, el alcohol interactúa a nivel epigenético con los receptores NMDA, modificando su funcionalidad y sensibilidad al tóxico. Diversos estudios apoyan que el etanol podría influir en diferentes momentos del circuito genético: la regulación epigenética, alterando los procesos de metilación del ADN y la acetilación y fosforilación de histonas (Chandrasekar 2013); el empalme o eliminación (*splicing*) de determinados fragmentos del pre-ARNm

correspondiente a las subunidades proteínicas del receptor NMDA (Acosta et al 2010); y la estabilidad del ARNm de subunidades determinadas (Anji et al 2011). Estas interacciones dinámicas y a múltiples niveles son responsables de la heterogeneidad y complejidad de las relaciones etanol-sistema NMDA (Brooks et al 2000, Starkman et al 2012).

En la práctica, el etanol (5-100 mM) inhibe de forma aguda las corrientes iónicas activadas por los NMDA en cultivos de neuronas hipocampales de ratón (Lovinger et al 1989) y el influjo de Ca^{2+} dependiente de los NMDA en estas neuronas (Hoffman et al 1989, Wirkner et al 1999). El efecto inhibitor del etanol en la actividad del canal se ha confirmado en muchas regiones cerebrales como el hipocampo (Lima-Landman et al 1989, Lovinger et al 1990), cortex (Li et al 2002), amígdala (Calton et al 1999), núcleo accumbens (Nie et al 1994) y núcleo estriado (Wang et al 2007). La reducción en la actividad NMDA tras la exposición aguda al etanol es concentración-dependiente, y tiene un inicio muy rápido (menos de 100 mseg) (Criswell et al 2004). Estudios sobre cultivos de neuronas corticales han demostrado que el etanol disminuye la probabilidad de apertura del canal del receptor NMDA y el tiempo medio de apertura del mismo (Wright et al 1996).

Además, la alteración que provoca el etanol en la expresión y funcionalidad de los receptores NMDA depende del periodo de exposición al tóxico. La exposición aguda *in vivo* inhibe la función del receptor NMDA, mientras que el tratamiento más allá de 24 horas *in vivo* e *in vitro* incrementa el número y funcionalidad del receptor (Kumari et al 2001), fenómeno conocido como “sobre-regulación” adaptativa de los receptores NMDA, y que se ha descrito en el cerebro de animales que han sido tratados de forma mantenida con alcohol (Tabakoff et al 1996). En ratones que han consumido etanol durante periodos entre cinco y once días se ha demostrado un incremento en el número de receptores NMDA en el hipocampo y otras zonas cerebrales conllevando un incremento de la actividad de dichos receptores desde 1 hora después de la retirada del etanol hasta como mínimo 7 horas después (Thomas et al 1998), y que dicho aumento en el número de receptores se relacionaba con la aparición de convulsiones por abstinencia alcohólica (Grant et al 1990, Gulya et al 1991, Snell et al 1993, Sanna et al 1993). Por otra parte, la administración de diferentes antagonistas NMDA se ha demostrado que puede prevenir los efectos bioquímicos y conductuales asociados al síndrome de abstinencia alcohólica, incluidas las convulsiones (Snell et al 2000). Sin embargo, cuando se evalúan los efectos del consumo de alcohol en la densidad del receptor NMDA maduro de animales durante periodos de tiempo mayores, los resultados son controvertidos, con alteraciones en la densidad de receptores variables (Rudolph et al 1997, Tremwell et al 1994).

Tal y como se han descrito en los capítulos precedentes, los estudios sobre tejido cerebral humano son escasos y con resultados dispares. A pesar de los centenares de trabajos de investigación desarrollados las pasadas décadas, el verdadero mecanismo a través del cual el alcohol inflige el daño neuronal no está aclarado. El presente estudio tenía como objetivo estudiar en tejido humano los posibles efectos del consumo regular de alcohol sobre los receptores NMDA maduros mediante técnicas autorradiográficas, valorando la posible alteración en la densidad de dichos receptores en personas que lo consumieron regularmente pero sin padecer aparentemente patología crónica asociada al alcoholismo.

AUSENCIA DE CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE LOS RECEPTORES NMDA ENTRE CONSUMIDORES DE ALCOHOL Y CONTROLES, EN LAS ÁREAS CEREBRALES ESTUDIADAS

Las lesiones cerebrales crónicas inducidas por el alcohol se manifiestan a través de alteraciones cognitivas y psicológicas, relacionadas con cambios en determinadas zonas cerebrales, que incluyen el córtex frontal y el hipocampo. A pesar del gran número de personas afectadas por problemas neurológicos causados por el alcoholismo crónico, en la actualidad seguimos sin conocer los mecanismos moleculares de la neurotoxicidad inducida por el etanol.

La excitotoxicidad, término que define la letal sobreestimulación de las neuronas por el glutamato u otros aminoácidos relacionados (Rothman 1986), está considerada uno de los mecanismos a través del cual el etanol podría ejercer sus efectos a largo plazo. En las últimas décadas los resultados de múltiples estudios realizados sobre tejido neurológico en animales han demostrado que el alcohol puede alterar el funcionamiento del sistema glutamatérgico, en especial el sistema NMDA. Se ha visto que una exposición prolongada al alcohol (cinco o más días) provoca una sobre-regulación temporal del número de receptores NMDA, presumiblemente en compensación por los efectos inhibitorios ejercidos por el tóxico, y reversible en roedores al cabo de 24-48 horas de retirada del alcohol. La abstinencia brusca del alcohol provoca en el animal una liberación brusca de los receptores en número aumentado, que sumada a los altos niveles de glutamato extracelular, conlleva en consecuencia un incremento de los efectos glutamatérgicos, provocando un

aumento del flujo de calcio en el interior de las neuronas afectas (Grant 1990, Trevisan 1994). Dichos cambios generan una situación clínica de hiperexcitabilidad en el animal abstinentes, que se manifiesta por temblores e incluso convulsiones. Se ha hipotetizado que los efectos acumulativos de tales sucesos, repetidos a lo largo de un largo período de tiempo, podrían provocar finalmente un daño permanente neuronal. Sin embargo, debe recordarse que no han podido demostrarse los mismos efectos en animales expuestos de forma más prolongada (más allá de unos días) al etanol. Así, en ratas que estuvieron consumiendo alcohol durante 28 semanas, y a las que se les retiró el tóxico de la dieta 24 horas antes de ser sacrificadas, no se detectaron diferencias significativas con los controles en la unión del MK801 tritiado en córtex, hipocampo y tálamo (Tremwel 1994).

Los trabajos publicados sobre el estudio de la densidad de receptores NMDA maduros en tejido humano son muy escasos, debido a la dificultad, tanto por motivos éticos como burocráticos, para conseguir las muestras adecuadas en número suficiente, y a la complejidad para establecer de forma retrospectiva una historia clínica detallada de los antecedentes médicos y del consumo de alcohol.

En nuestra revisión de la literatura sólo hemos encontrado unos pocos artículos sobre el tema. En el artículo publicado por Michaelis y colaboradores (1990) sobre un estudio de membranas aisladas de hipocampo humano, los autores detectaron una B_{max} para el L-glutamato significativamente mayor en los alcohólicos ($p < 0.05$). Cuando se analizó la unión de un marcador tritiado específico de los receptores NMDA en las preparaciones de membranas (CPP), se detectó una disminución significativa de la densidad de receptores NMDA en tres de las cuatro concentraciones de ligando utilizadas, con una B_{max} tres veces menor a los controles, aunque paralelamente la afinidad del marcador por el receptor (cuantificada a través de la K_D) era tres veces mayor en los alcohólicos. Es decir, en la pequeña muestra analizada (5 alcohólicos y 3 controles) la densidad de receptores glutamatérgicos aumentaba en los alcohólicos, aunque la densidad de los receptores NMDA disminuía. Estos mismos receptores mostraban sin embargo una mayor afinidad por el mismo radioligando. Los autores no arriesgaron una hipótesis sobre estos hallazgos, más allá de comentar la necesidad de posteriores estudios que determinaran los efectos del alcoholismo crónico en todos los subtipos de receptores del glutamato, y que permitieran defender que los cambios en la afinidad de los sitios de unión al glutamato son debidas sólo a cambios en la afinidad de los receptores NMDA.

El mismo grupo de autores publicó un nuevo artículo sobre el tema tres años más tarde (Michaelis et al 1993), a partir de estudios también realizados sobre membranas sinápticas. De hecho, este artículo probablemente se basa en el estudio de la misma muestra de alcohólicos sobre la que realizaron los experimentos publicados en 1990 (Michaelis et al 1990). Los autores sugerían que los cambios en los receptores NMDA descritos en el anterior artículo constituían una adaptación de las neuronas humanas al contacto prolongado con el etanol, incrementando la afinidad por el ligando y disminuyendo la densidad de receptores NMDA. Tal respuesta adaptativa podría indicar que las neuronas en los cerebros de alcohólicos crónicos se convierten en progresivamente más dependientes de los incrementos de densidad de otros tipos de receptores glutamatérgicos, como el AMPA/kainato o los receptores metabotrópicos.

Un tercer artículo (Dodd et al 1992) fue publicado a partir de los experimentos realizados sobre homogeneizados de membranas de córtex cerebral de alcohólicos, expuestas a [³H]MK-801. Los autores no detectaron diferencias entre la densidad de los receptores NMDA en alcohólicos (n=10) y controles (n=6).

Al revisar la escasa literatura disponible sobre autorradiografía de receptores para cuantificar la densidad de receptores cerebrales NMDA de alcohólicos, tan sólo hemos encontrado dos artículos, firmados por el mismo grupo de autores y realizados muy probablemente sobre los mismos 13 pacientes alcohólicos y 13 controles, en áreas cerebrales diferentes. Los alcohólicos cuyas muestras cerebrales fueron estudiadas se encontraban en abstinencia de alcohol como mínimo desde dos semanas antes a su fallecimiento, con lo que se eliminaban los posibles cambios en la densidad de receptores atribuibles al síndrome de abstinencia aguda por el alcohol. En el primer artículo (Freund et al 1996) los autores describieron un incremento modesto pero estadísticamente significativo en la densidad (B_{max}) de los complejos canal-receptor NMDA en las muestras de córtex frontal superior (área 8 de Brodmann) de los alcohólicos, mediante el uso de glutamato y CGP-39653 tritiados, aunque con el MK-801 tritiado los resultados no fueron estadísticamente significativos. Los investigadores postularon la hipótesis de que, en este grupo de alcohólicos, la sobre-regulación de los receptores NMDA representaba una fase temprana de neurotoxicidad inducida por el etanol, que precedía a una eventual pérdida un aumento neuronal.

En el artículo publicado tres años más tarde (Freund et al 1999), los investigadores describieron nuevamente el uso de los mismos ligandos para determinar la unión o afinidad a los receptores NMDA en el córtex cingulado, el *cornu Ammonis* del hipocampo, y en el

vermis cerebeloso. Sólo detectaron diferencias significativas en la densidad de captación de glutamato tritiado (B_{max}) en el córtex cingulado, pero no en la captación en la misma área de CGP-39653 y MK-801. En las otras dos áreas no se detectaron diferencias entre la densidad de receptores entre consumidores de alcohol y controles con ninguno de los marcadores.

En resumen, los escasos trabajos publicados hasta el momento sobre tejido humano refieren resultados y conclusiones heterogéneos:

1. En homogeneizados de membrana:
 - a. Michaelis detectó una disminución significativa de la densidad de receptores NMDA en hipocampo, medida mediante CPP tritiado
 - b. Dodd, en muestras de córtex frontal cerebral, expuestas a [3 H]MK-801, no detectó diferencias
2. En autorradiografía:
 - a. Freund detectó un aumento de densidad significativa en córtex frontal con glutamato y CPP tritiados en los alcohólicos, pero no con MK-801 tritiado
 - b. Tres años más tarde, en córtex cingulado detectó diferencias en la captación de glutamato tritiado (no con los otros dos marcadores). Sin embargo, en hipocampo y vermis cerebeloso no detectó diferencias significativas con ninguno de los tres marcadores

En los experimentos realizados en la presente tesis no hemos detectado diferencias significativas entre la densidad de receptores NMDA de consumidores de etanol y de controles (no consumidores) en ninguna de las áreas estudiadas. Existen varios motivos, no excluyentes entre sí, que pueden explicar la heterogeneidad de los resultados descritos en la literatura, así como nuestros propios hallazgos negativos.

Estudios previos sobre modelos animales. Limitaciones para la extrapolación de resultados a humanos

Debido a la necesidad de disponer de modelos experimentales suficientes para llevar a cabo los estudios sobre tejido vivo, y a los retos que suponen los ensayos clínicos para probar la eficacia potencial de nuevos agentes terapéuticos, se ha producido una explosión en la generación y disponibilidad de modelos de ratones transgénicos utilizados en la investigación de diversas enfermedades neurodegenerativas muy prevalentes, como el alcoholismo. Estos modelos experimentales resultan muy útiles en la investigación básica, y permiten obtener de forma sencilla abundantes muestras de tejido, provenientes de

individuos controlados sin variabilidades individuales que puedan pervertir la interpretación de los resultados. Por desgracia los modelos animales imitan algunos, pero no todos los aspectos de la patología en humanos (Bales 2012, Li 2013). El mundo científico ha asumido frecuentemente que los descubrimientos bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos y genéticos en animales más simples tienen su contrapartida exacta en la biología humana. Sin embargo, los resultados abrumadoramente positivos obtenidos en roedores frecuentemente no se han traducido en resultados clínicos positivos similares al probar diferentes agentes clínicos en seres humanos en estudios en fase III (Imbimbo 2009, Hermann et al 2011). En el caso concreto de la interacción entre etanol y receptores NMDA, la secuencia aminoacídica de determinadas subunidades de los receptores glutamatérgicos en roedores y en humanos, aunque similar, posee algunas diferencias (Kamboj 1994). Estas en apariencia pequeñas diferencias pueden ser importantes, ya que la sustitución de un simple aminoácido puede alterar dramáticamente las propiedades del canal (Seeburg et al 1993).

Para los seres humanos, como consecuencia del consumo excesivo de alcohol sobrevienen problemas laborales, personales que llegan incluso a la desintegración de las relaciones familiares, trastornos psiquiátricos como la ansiedad, la depresión, y dificultades legales. De éstos, sólo cuadros similares a la ansiedad y a la depresión se modelan en roedores. Los seres humanos continúan bebiendo a pesar de los efectos adversos médicos o sociales, e incluso hasta la muerte. Por el contrario, los roedores no beben suficiente alcohol bajo la mayoría de circunstancias para desarrollar las clases de mayores complicaciones médicas que se observan en los seres humanos (Crabbe et al 2013), por lo que no pueden ser considerados modelos adecuados de estudios más que en determinadas circunstancias.

El organismo humano no sólo es mucho más complejo que cualquier modelo animal, sino que los seres humanos pueden resolver problemas biológicos de maneras diferentes, incluso que nuestros parientes más cercanos en el reino animal. Esto es evidente en el contexto de diversas enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis múltiple, en la que la evolución clínica de la enfermedad en humanos forma de crisis y episodios intercrisis no puede reproducirse en el modelo clásico experimental con ratones (Gold 2006). En el caso de la relación etanol-SNC los animales ofrecen un sistema más simple con el cual trabajar, pero si este sistema es tan simple que los humanos ya no lo utilizan, entonces el modelo no guardará relación con el objetivo principal del estudio. Podemos aislar las acciones separadas del etanol en diversos sistemas, pero perder la capacidad de

descubrir las complejas interconexiones entre los sistemas. Por ejemplo, en los humanos alcohólicos pueden coexistir patologías relacionadas con el alcohol que afecten a diferentes órganos y sistemas y que sumen efectos lesivos neurológicos, como la cirrosis hepática, no reproducible en los modelos animales (Leo et al 1983).

Además, la longevidad inherente a la especie delimitará, como es evidente, el período en que dichos individuos pueden contactar con una sustancia de abuso. El periodo medio de supervivencia de los roedores utilizados en el laboratorio son semanas, mientras que un ser humano puede ingerir alcohol durante décadas. Son animales cuyos períodos de gestación son más cortos y cuyas vidas son más cortas, lo que nos permite aplicar presiones genéticas selectivas para elaborar modelos animales, pero perdemos la capacidad de estudiar los efectos del alcohol a largo plazo. Cuando tratamos animales con etanol, la velocidad con la que desaparece del organismo no es muy diferente de la velocidad en los seres humanos; pero el tiempo que el etanol pasa en el organismo representa una fracción mucho más grande de la vida del animal que una dosis similar en un ser humano. Además, el contacto con el etanol a lo largo de muchos años puede condicionar no sólo lesiones más intensas e irreversibles, sino la puesta en marcha de mecanismos de compensación aún mal comprendidos. Por tanto, aunque la correspondencia estrecha entre la estructura básica del genoma de los humanos y el de los ratones nos permite mantener mucha confianza en que las influencias genéticas humanas sobre la fisiología, la bioquímica y el comportamiento humanos van a parecerse a las de los animales, la prueba definitiva de todos estos factores será la capacidad de tomar un dato observado en animales y usarlo para predecir una conducta, una reacción fisiológica o bioquímica, en seres humanos.

Por último, otra de las razones que limita a extrapolación de resultados de modelos animales al cerebro humano proviene de las propias técnicas de laboratorio empleadas mayoritariamente en los estudios sobre animales. Muchos de los experimentos realizados en animales han sido sobre homogeneizados de membranas neuronales. Esta técnica aporta valiosos datos de análisis sobre la relación NMDA-etanol, aunque con dos limitaciones importantes: Por un lado, puede disminuir la concentración de iones como el magnesio y aminoácidos como la glicina, que habitualmente se encuentran en abundancia en los tejidos intactos, debido a los intensos lavados de los homogeneizados. Según el marcador a estudio, la depleción de estas sustancias puede interferir en los resultados, tal y como se discute más adelante. Por otro, el estudio de homogeneizados no permite, a diferencia de las técnicas autorradiográficas, la detección de cambios en la unión de receptores que pueden ocurrir en regiones anatómicamente concretas. Dado que muy recientemente se

han publicado resultados que delimitan diferencias significativas en la capacidad del etanol para interferir en el ARN de subunidades NMDA concretas entre zonas del córtex frontal en humanos (Jin et al 2014), la extrapolación de resultados a los humanos, donde resulta imprescindible la delimitación exacta de los grupos neuronales afectados, se convierte aún más en objeto de controversia.

Características inherentes al marcador utilizado: MK-801

De entre los experimentos citados, Michaelis et al (1990) en homogeneizados de membranas, y Freund et al (1999) sobre tejido intacto, no detectaron resultados positivos al usar MK-801, aunque sí obtuvieron resultados positivos con glutamato y CPP. En los experimentos en los que se basa la presente tesis, en los que se utilizó como marcador el MK-801 tritiado, tampoco se han detectado diferencias en la densidad de unión del marcador a los receptores de alcohólicos y controles. Cabe la posibilidad que el resultado negativo no responda a la falta de relación entre consumo de alcohol y cambios en el sistema NMDA, sino que sea debido a características particulares del MK-801.

El sitio de unión del MK-801 se encuentra en el interior del canal de membrana del receptor, a diferencia de los sitios de unión de los otros dos marcadores comentados (glutamato, agonista, y CPP, antagonista), que se encuentran en la superficie del receptor. Dicha colocación del sitio de unión confiere al MK-801 una relación diferente con las diferentes moléculas que actúan como moderadoras de la actividad del receptor. Al estar su sitio de unión en el interior del canal del receptor, diferencias en el grado de apertura de dicho canal pueden limitar la capacidad del MK-801 de interactuar con los receptores NMDA del tejido.

Las unidades receptor NMDA-canal iónico son estructuras complejas con determinados sitios de control encargados de regular la función del canal en respuesta al glutamato, como la glicina, el magnesio, o los sitios de unión a las poliaminas. Los cambios en dichos sitios de control pueden modificar la sensibilidad del receptor NMDA a los diferentes agonistas y antagonistas. Por ejemplo, bajas concentraciones de iones magnesio incrementan la unión al antagonista CGP tritiado en su sitio de reconocimiento, y de la unión del MK-801 tritiado a su sitio en el interior de canal (Michaelis et al 1994). En animales, el alcohol disminuye la intensidad de unión del MK-801 tritiado dentro del canal NMDA en ausencia de la coagonista glicina, aunque la unión máxima tras una hora de incubación no se ve alterada (Rabe et al 1990). Sin embargo, en presencia de glicina, el alcohol no es capaz de alterar la unión del MK-801 (Snell et al 1993).

En el tejido humano Freund (Freund et al 1996) también obtuvo un resultado similar. Aparentemente, los tejidos intactos (no homogeneizados) contienen ya concentraciones óptimas de glicina para la unión del MK-801. Los autores comprobaron que el etanol añadido *in vitro* no ejercía efecto alguno en la unión del marcador a secciones del tejido intacto, y sugerían que el motivo era que las muestras de tejido intacto la glicina estaba presente en medio. De hecho, una vez bloqueado el sitio de la glicina mediante la adición de un agonista de la misma al tampón de incubación, al añadir alcohol *in vitro* sí que objetivaron una disminución de la unión al tejido del MK-801. Por tanto, el bloqueo de la unión al sitio de la glicina efectivamente era imprescindible para la interacción etanol-MK-801- NMDA.

En el estudio publicado por Dodd (Dodd et al 1992), utilizando homogeneizados de membranas de córtex frontal de alcohólicos y controles, no se detectaron diferencias en la densidad de receptores NMDA unidos a MK-801 entre ambos grupos. Esta aparente contradicción con lo arriba expuesto queda explicada al analizar el tampón de incubación utilizado por los investigadores, en el cual fue añadida la glicina, a concentración 30 μM . Por este motivo en el tejido la glicina estaba presente, lo que explicaría la negatividad de los resultados con este marcador.

Otro ejemplo a favor de que la causa de la negatividad de nuestros resultados pueda estar relacionada con el marcador utilizado es el resultado obtenido por Michaelis en uno de sus estudios publicados (Michaelis et al 1990). Este investigador detectó diferencias significativas entre la densidad de receptores NMDA en muestras hipocampales de humanos alcohólicos y controles, medidos mediante la unión al CPP tritiado. Sin embargo, Freund (Freund et al 1999) no detectó diferencias entre la densidad de receptores NMDA en hipocampo mediante autorradiografía sobre una muestra de alcohólicos y controles, utilizando el mismo marcador tritiado.

El uso por tanto de tejido cerebral intacto, con niveles conservados de glicina, puede por tanto alterar la interacción entre receptores NMDA y MK-801, minimizando posibles diferencias en la densidad de receptores. Es posible que las características especiales del MK-801, debidas a su sitio de unión en el interior del canal iónico, y a la influencia que ejercen sobre su capacidad de unión muy diferentes sustancias, como la glicina o el magnesio, puedan explicar la dificultad para detectar cambios significativos provocados por el alcohol.

En nuestros experimentos, la autorradiografía de receptores utilizando MK-801 tritiado tampoco detectó diferencias significativas, incluso utilizando una muestra mayor de pacientes que en los experimentos anteriores.

Características asociadas a las áreas cerebrales estudiadas

Se sabe que, incluso dentro de una misma región cerebral, existen diferentes densidades de receptores glutamatérgicos. Además, los experimentos sugieren que la sensibilidad al alcohol varía entre las diferentes áreas cerebrales de un mismo individuo, por lo que la intensidad de los cambios producidos por el alcohol podría ser selectiva en determinadas áreas o regiones cerebrales. Por ejemplo, en los experimentos sobre tejido humano ya referidos de Freund et al (1996, 1999), sobre 13 alcohólicos y 13 controles abstemios. En 1996 los autores describieron un incremento modesto pero estadísticamente significativo en la densidad (B_{max}) de los complejos canal-receptor NMDA en las muestras de córtex frontal superior (área 8 de Brodmann) de los alcohólicos, mediante el uso de glutamato y CGP-39653 tritiados. En el artículo publicado tres años más tarde sólo detectaron diferencias significativas en la densidad de captación de glutamato tritiado (B_{max}) en el córtex cingulado. En las otras dos áreas estudiadas (hipocampo y vermis cerebeloso) no se detectaron diferencias con ninguno de los marcadores utilizado, lo cual sugiere diferencias en la sensibilidad de los receptores NMDA de diferentes áreas o regiones cerebrales al estímulo del alcohol.

Estudios muy recientes centrados en la detección del ARN correspondiente a las subunidades NMDA en muestras cerebrales de consumidores de alcohol han puesto de manifiesto diferencias en la sensibilidad al etanol en zonas concretas del córtex frontal: el etanol modificó subunidades NR3A en el córtex orbitofrontal, pero no en el cortex frontal dorso-lateral (Jin et al 2014). Estos resultados indican que en el cerebro humano el estudio de los receptores glutamatérgicos debe incluir además demarcaciones concretas de las áreas y regiones estudiadas.

En nuestros experimentos el córtex frontal estudiado proveniente del Instituto Anatómico Forense (IAF) , de 14 de los pacientes y 6 de los controles, correspondía a las áreas motoras 4 y 6 de Brodmann, situadas en una zona dorsal en relación al área 8 utilizada por Freund. Desgraciadamente, no pudo disponerse de una información similar en el tejido proveniente del Banco de Tejidos Neurológicos (BTN), aunque de hecho al realizar el análisis estadístico entre los pacientes provenientes del Instituto Anatómico Forense (IAF) y los del Banco de Tejidos Neurológicos (BTN) no se detectaron diferencias significativas en la densidad de los NMDA entre los alcohólicos de ambos grupos.

Variabilidad asociada a las características clínicas de los pacientes

Si en los animales, a pesar de rígidos protocolos, los resultados pueden ser heterogéneos y controvertidos, en el caso de los seres humanos las dificultades para interpretar los resultados de los experimentos se multiplican. En los aún escasos trabajos publicados hasta el momento sobre tejido cerebral humano, los investigadores han detectado variables no descritas en animales que de forma independiente podían modificar la densidad de diferentes receptores. Un ejemplo claro es la posible coexistencia en los humanos alcohólicos de diferentes patologías secundarias al alcohol y que sumen sus efectos lesivos neurológicos a través de varios órganos y sistemas, como la cirrosis hepática, que no es reproducible en modelos animales. Un reciente trabajo ha detectado diferencias significativas en los niveles del ARNm correspondientes a las subunidades NR1, NR2A y NR2B en el córtex de alcohólicos cirróticos y no cirróticos (Ridge et al 2009), que confirma que la variabilidad clínica adquirida a lo largo de la vida de los individuos multiplica las dificultades de interpretación de los resultados.

Por ejemplo, en relación a receptores glutamatérgicos no NMDA, Freund (Freund et al 1996) detectó que los receptores kainato y AMPA estaban incrementados en individuos fallecidos por neumonía asociada a hipoxia aguda. El autor sugirió que la misma hipoxia, más que la propia causa infecciosa, podría alterar la unión de estos receptores.

Piggott et al (1992) sugirieron que la muerte súbita (entendida como la acaecida bruscamente, con independencia del diagnóstico final anatomopatológico) incrementaba la densidad NMDA, y que por tanto el estado agónico era un factor que podía modificar las mediciones de dichos receptores. Aunque experimentos posteriores (Freund, y los de la actual tesis) no han confirmado estos resultados, sigue siendo posible que características individuales de los pacientes incluidos en la muestra puedan implicar diferencias en los resultados entre diferentes experimentos.

Cambios en los receptores NMDA no detectables por autorradiografía

Nuestro estudio es una exploración en la naturaleza de los cambios en los receptores glutamatérgicos asociados al alcoholismo crónico. Las consecuencias de la interacción entre un fármaco o tóxico y un receptor pueden ser muy importantes para la funcionalidad de un sistema, y no afectar necesariamente a la densidad del receptor. La autorradiografía de receptores es una técnica que permite cuantificar la densidad de un receptor maduro y activo en una muestra de tejido. Por tanto, puede delimitar las zonas donde se encuentran estos receptores maduros, aunque no permite detectar la situación de los mismos receptores cuando aún no están activos, en cualquiera de las fases de síntesis y

ensamblaje de subunidades, de transporte de las mismas a los puntos de unión de la membrana celular...Tampoco permite diferenciar la composición de las subunidades proteicas de los receptores NMDA.

Tal y como hemos analizado en las páginas precedentes, los resultados en estudios sobre tejido humano de receptores maduros NMDA son controvertidos. Sin embargo, al estudiar el efecto crónico del etanol sobre diferentes subunidades del receptor NMDA sí se han detectado cambios significativos. La detección de diferencias regionales en el cerebro en cuanto a la sensibilidad de los receptores NMDA al etanol ha motivado a diferentes grupos de investigadores a estudiar la relación entre la composición molecular de las subunidades de los receptores NMDA y la sensibilidad de las diferentes combinaciones de dichas subunidades al etanol. Debido a las diversas variaciones de combinaciones entre los diferentes tipos de subunidades, pueden existir receptores NMDA con capacidades funcionales diferentes. Qué receptores glutamatérgicos estén activos en una neurona depende de qué genes se transcriben, y dicha transcripción puede depender del estado de desarrollo, la región cerebral, el tipo de neurona, la actividad sináptica, y del consumo de alcohol (Moykkynen et al 2012). En conjunto los estudios apuntan a que la hiperexcitabilidad del canal NMDA tras la exposición crónica al etanol y su abstinencia debe relacionarse con el incremento en el ARNm y en los niveles de subunidades NMDA (Ron et al 2009).

Las subunidades glutamatérgicas NMDA que mejor se han relacionado con las patologías provocadas por el alcoholismo son las NR1, NR2A, NR2C (Mayfield et al 2002, Flatscher-Bader et al 2005, Domart et al 2012), en estudios realizados sobre muestras cerebrales post-mortem de alcohólicos. En el trabajo más reciente publicado sobre este tema, sobre muestras de 19 alcohólicos, se detectaron incrementos significativos de los ARNm correspondientes a las subunidades NR1, NR2A, NR2C, NR2D y NR3A en el giro dentado del hipocampo, y en las NR3A en el cortex orbitofrontal, aunque en el cortex prefrontal dorso-lateral no se detectaron diferencias entre alcohólicos y controles (Jin et al 2014). Estos resultados en humanos confirman los hallazgos previos detectados en muestras de animales, que habían detectado incrementos en el número de subunidades NR1, NR2A y NR2B de los receptores NMDA en diversos estudios sobre animales abstinentes tras días-semanas de contacto con etanol (Follesa et al 1996, Kumari et al 2001, Roberto et al 2004, Nagy et al 2003 y 2004a,b,c), cambios reversibles tras una semana de abstinencia mantenida (Roberto et al 2006). Además, diferentes experimentos in vitro han establecido que los canales conteniendo NR2A y NR2B son más sensibles al etanol que los

canales que contienen NR2C y NR2D (Chu 1995, Koltchine 1993, Masood 1994). Más recientemente se ha objetivado que la máxima inhibición por el etanol se detecta en las NR1-2B/NR2C, y las mínimas en las NR1-3B/NR2C, NR-3B/NR2D y NR1-4B/NR2C (Raeder et al 2008, Chandrasekar 2013). Por tanto, el etanol favorecería el aumento de subunidades que a su vez son más sensibles a los efectos del tóxico, un mecanismo de “retro-alimentación” que agrandaría la influencia lesiva del etanol.

Los cambios en las subunidades experimentados pueden modificar la neurotransmisión y adaptar las redes neuronales a la exposición al etanol, alcanzándose un nuevo equilibrio mientras el tóxico se encuentra en el medio, mediante continuos reajustes de los niveles de expresión de los receptores de neurotransmisores (Jin et al 2014). La inhibición por el etanol de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos disminuye la excitabilidad neuronal, y este efecto inhibitorio provoca una sobre-regulación compensatoria de los niveles del ARNm correspondiente a los receptores. Al igual que ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, en la cual los niveles de ARNm que codifica el subtipo M1 de los receptores muscarínicos en la corteza temporal de pacientes con esta enfermedad neurodegenerativa son aproximadamente tres veces superiores a los cerebros control, aunque la densidad global de los receptores muscarínicos maduros, cuantificada por autorradiografía, no muestra apenas cambios, (Harrison et al 1991), en el cerebro del alcohólico crónico los efectos del tóxico sólo podrían detectarse estudiando la composición de las subunidades de receptor. El único momento en que podrían objetivarse cambios en la densidad de los NMDA cuantificables por autorradiografía sería durante la abstinencia, debido a la desaparición del equilibrio excitación-inhibición, y a la puesta en marcha del fenómeno excitotóxico que provocaría la clínica asociada a la abstinencia (delirium, convulsiones...).

Siguiendo la historia natural de la neuropatología del alcoholismo, según la hipótesis glutamatérgica de los déficits neurológicos provocados por el alcohol, los déficits permanentes de los pacientes alcohólicos podrían ser en parte provocados por la degeneración neuronal mediada por las frecuentes reacciones de excitotoxicidad inducidas por el etanol. De hecho, actualmente se hipotetiza que la relación entre la muerte celular y el etanol incluye directamente al sistema glutamatérgico, a través de diferentes mecanismos: la propia inhibición de los receptores NMDA y las reacciones derivadas de la misma, como la excitotoxicidad; la interferencia en las señales de diversos factores neurotróficos como el extremo C-terminal del receptor NMDA, relacionado con sitios de fosforilación de quinasas y proteínas de unión al citoesqueleto (Tingley et al 1997, Ehlers et al 1995); la

inducción del estrés oxidativo en el tejido nervioso, a través fundamentalmente de la producción de acetaldehído por la alcohol-deshidrogenasa citosólica (Flora et al 2012); la modulación de las señales del ácido retinoico, la alteración de las corrientes de los canales de potasio, la deficiencia de tiamina y la interferencia en la regulación translacional (Chandrasekar 2013).

AUSENCIA DE CAMBIOS EN LA DENSIDAD DE RECEPTORES NMDA ASOCIADOS AL ESTADO AGÓNICO

El tejido cerebral de los pacientes consumidores de alcohol que fallecieron de forma súbita, es decir, sin enfermedad o descompensación aparente de enfermedad durante los días previos, no mostraron cambios significativos en la densidad de dichos receptores, en comparación con la de los consumidores fallecidos por enfermedades ya detectadas los días previos a su defunción.

Este resultado es claramente diferente al obtenido por Piggot en 1992. En su estudio, el autor inglés analizó un total de 17 muestras de córtex occipital de pacientes fallecidos por diferentes circunstancias. En cuatro de ellos la causa fue la muerte súbita, entendida como la acaecida bruscamente, con independencia del diagnóstico final anatomopatológico. La densidad de receptores atendiendo a su unión al MK-801 tritiado fue mayor en el córtex de estos cuatro casos.

Son varias las posibles explicaciones razonables de la diferencia entre dicho resultado y el obtenido en los experimentos en los que se basa la presente tesis. Por una parte, la muestra analizada fue, como es habitual en los estudios publicados sobre tejido humano, muy limitada: Cuatro pacientes fallecidos por muerte súbita, frente a 13 fallecidos en otras circunstancias. En nuestros experimentos, la proporción se encuentra invertida: 13 pacientes fallecidos de forma brusca, frente a sólo 3 con morbilidad clínicamente activa los días previos a su fallecimiento.

En segundo lugar, el estudio de Piggot se realizó sobre muestras de córtex occipital, y el de la presente tesis sobre córtex frontal. Como se ha comentado anteriormente, existen diferencias en la sensibilidad de los receptores NMDA entre áreas cerebrales, por lo que no puede descartarse que el córtex occipital pueda manifestar una mayor afinidad a estímulos como la hipoxia que otras áreas corticales.

Por último, un detalle muy importante: en el estudio de Piggot no se describe el consumo de alcohol entre los individuos incluidos en su muestra. Tan sólo se descartan patologías psiquiátricas o neurodegenerativas, sin concretar. Es posible por tanto que parte de la muestra perteneciera a individuos consumidores de alcohol, por lo que el papel etiopatológico del tóxico sobre los cambios de los receptores no es analizable.

Nuestros resultados aportan información sobre la compleja relación entre el sistema glutamatérgico y el alcoholismo humano. A la luz de nuestros resultados negativos, sumados a los obtenidos mediante técnicas que analizan la composición de las subunidades del receptor NMDA (PCR, hibridación in situ), parece claro que el etanol, en su interacción con el sistema glutamatérgico, actúa modificando no el número global de receptores activos, sino la composición de las subunidades de los mismos. A través de estos cambios, que implican alteraciones en la funcionalidad del receptor resultante y en su sensibilidad al tóxico, se provocarían las alteraciones clínicas que conocemos e intentamos paliar. Dada la dificultad para investigar con tejido cerebral humano, un gran número de cuestiones fundamentales quedan por aclarar: la relación entre las variaciones en las subunidades y la aparición de las manifestaciones clínicas del alcoholismo; la neurodegeneración y las lesiones neurológicas irreversibles, que según la hipótesis glutamatérgica estarían mediadas por la excitotoxicidad, y que implicaría finalmente alteraciones en la densidad de receptores activos detectables; la relación entre el etanol y las alteraciones en los circuitos NMDA y otros receptores como los AMPA-kainato; la implicación para otros sistemas neurotransmisores, como el serotoninérgico o el dopaminérgico... Muy probablemente la combinación de estudios histológicos, autorradiográficos con diferentes ligandos, y con técnicas tipo hibridación in situ, nos permitan en los próximos años avanzar en el conocimiento de los efectos del etanol en el sistema nervioso humano.

CONCLUSIONES

1.- La distribución y densidad de los receptores NMDA cerebrales detectadas en los estudios de autorradiografía varían según la riqueza en dichos receptores en las áreas estudiadas. Las regiones incluidas en el estudio con mayor densidad de receptores NMDA son el hipocampo y el córtex frontal. Núcleo estriado (putamen y caudado) y cerebelo poseen una baja densidad de receptores, localizados fundamentalmente en sustancia gris.

2.- El consumo prolongado de alcohol no modifica significativamente la densidad de receptores NMDA en las áreas estudiadas. En consumidores crónicos de alcohol, que aún no ha desarrollado patologías crónicas con traducción clínica (demencia, delirium, alteraciones psiquiátricas...) no se han detectado alteraciones en la densidad de receptores maduros NMDA. A la luz de los recientes estudios sobre las subunidades del receptor NMDA, el etanol probablemente actúa modificando la composición y proporción de las mismas, y a través de estos cambios provoca las alteraciones funcionales en el sistema glutamatérgico, sin que se observen cambios en la densidad global de estos receptores.

3.- No se han detectado diferencias significativas entre la densidad de receptores NMDA en pacientes con consumo excesivo de alcohol, pero que abandonaron dicho consumo semanas antes de su fallecimiento, y la densidad de los mismos receptores en consumidores que han mantenido la ingesta hasta el óbito. Estos resultados son coherentes con los conocimientos actuales sobre la hipótesis glutamatérgica de los daños provocados por el alcohol. Debido a los fenómenos asociados de sobre-regulación adaptativa e inhibición funcional de los receptores NDMA bajo los efectos del etanol, la densidad global de los mismos puede mantenerse estable mientras el individuo siga manteniendo la ingesta de forma regular. Durante la fase de abstinencia aguda, la liberación brusca de receptores inhibidos hasta ese momento, y el incremento real del número de los mismos (sobre-regulación) provocarían la hiperestimulación glutamatérgica y la excitotoxicidad, relacionada con la clínica conocida como abstinencia (agitación,

delirium, convulsiones). En ese momento probablemente sí se detectarían alteraciones en la densidad de receptores, durante un período de varios días. En todo caso, al cabo de unas semanas en ausencia del tóxico en el medio, los receptores NDMA retornarían a sus niveles previos, por lo que tampoco se objetivarían alteraciones en su densidad en los estudios autorradiográficos.

4.- Finalmente, tampoco se han detectado diferencias en la densidad de receptores NMDA entre las muestras de tejido provenientes de alcohólicos fallecidos por muerte súbita y el resto de alcohólicos, ni entre los primeros y el grupo de controles. Aunque diversas patologías (relacionadas o no con el consumo de alcohol) como la cirrosis hepática o la hipoxia, pueden alterar el funcionamiento del sistema glutamatérgico, a tenor de nuestros resultados la muerte súbita no es una de ellas.

PUBLICACIÓN

NMDA receptors in frontal cortex and hippocampus of alcohol consumers

Eulalia Villegas¹, Ramon Estruch^{1,2}, Guadalupe Mengod³ & Roser Cortés³

Department of Internal Medicine, Hospital Clínic, Barcelona, Spain¹, CIBEROBN Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Spain² and Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB, CSIC-IDIBAPS, CIBERNED, Barcelona, Spain³

ABSTRACT

Specific binding of [³H]MK801 to N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the frontal cortex and hippocampus (CA1 and gyrus dentatus) was measured by receptor autoradiography in 16 Caucasian chronic alcohol consumers free of clinical manifestations of alcoholism, and compared with 16 Caucasian control subjects. Binding densities were not significantly different between heavy and moderate drinkers, neither between alcohol consumers that were abstinent or non-abstinent before death, nor between ethanol drinkers and controls. Continued alcohol consumption, in the absence of hepatic, neurologic or psychiatric disorders related to alcoholism, does not alter the binding properties of NMDA receptors in the brain areas studied.

Keywords Alcoholism, glutamate receptors, human brain, MK801, radioligand binding, receptor autoradiography.

Correspondence to: Eulalia Villegas, Hospital Dos de Maig, Dos de Maig 301, 08025 Barcelona, Spain. E-mail: eulalia.villegas@sanitatintegral.org

A number of studies have suggested that, at least partially, alcohol-induced brain damage associated to chronic alcohol consumption is mediated through changes in glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. This is supported by the effects of drugs such as acamprosate, a partial NMDA antagonist used in relapse prevention in alcohol-dependent patients (Hammarberg *et al.* 2009). Only few studies have addressed the analysis of glutamate receptors in relation to alcohol abuse in humans and have provided controversial results (Cummins, Sack & von Hungen 1990; Dodd *et al.* 1992; Freund & Anderson 1996, 1999; Ridge *et al.* 2008). Our hypothesis is that permanent neuronal damage produced by chronic alcohol consumption is in part due to progressive changes in NMDA receptors, and that these changes might develop before the beginning of clinical manifestations of chronic alcoholism, including dependence, craving and abstinence. Thus, we assessed here the density of NMDA receptors in frontal cortex and hippocampus—brain areas known to be notably affected by chronic alcohol consumption—in a group of 16 alcohol consumers (AC) (16 male, mean age 58 ± 12 years, post-mortem delay 19 ± 8 hours) in comparison to a control group of 16 non-drinkers (14 male and 2 female, mean age 60 ± 12 years, post-mortem delay

17 ± 5 hours) using autoradiographic techniques with the specific NMDA-antagonist [³H]MK801. AC subjects included had not suffered any hepatic, neurologic or psychiatric disorders related to alcoholism. They were classified as moderate consumers (40–80 g of absolute alcohol daily for at least 10 years) or heavy consumers (more than 80 g of absolute alcohol daily for at least 10 years, enough to develop chronic alcoholic pathology). We also discriminated between AC cases that were abstinent (alcohol withdrawal minimum 1 week before death) or non-abstinent (last ethanol ingestion less than 12 hours before death). In consequence, it is unlikely that these subjects would undergo a withdrawal situation that could eventually involve acute changes in NMDA receptors (see Supporting Information and Table S1 for additional data concerning the cases studied).

Densities of [³H]MK-801 binding were measured by microdensitometry on film autoradiograms in frontal cortex (layers II–VI), and CA1 (oriens and pyramidal layers) and gyrus dentatus (molecular layer) of the hippocampus (Fig. 1), and are summarized in Table 1. Statistical analysis (unpaired *t*-test, GraphPad Prism) revealed the absence of significant differences between the different groups analyzed. Covariance analysis (SPSS

for Windows) indicated no influence of liver fibrosis in our sample (see Supporting Information for detailed data).

Our results suggest that binding to frontal cortex and hippocampal NMDA receptors remains unaltered after chronic consumption of high doses of alcohol in the absence of clinical manifestations of alcoholism. Previous studies on hippocampal homogenates reported higher densities of [³H]glutamate binding in five alcoholics compared with three controls, with concomitant decreases in specific NMDA binding (Michaelis *et al.* 1990, 1993). Other authors (Dodd *et al.* 1992) found no differences in [³H]MK801 binding in cortical membrane preparations between 10 alcoholics and 6 controls. Finally, Ridge *et al.* (2008) detected decreases in the

expression of NR1, NR2A and NR2B NMDA receptor subunits in cerebral cortex only in cirrhotic alcoholics, but not in alcoholics without liver disease. Using receptor autoradiography, Freund & Anderson (1996, 1999) found significant increments in binding in frontal cortex (13 abstinent alcoholics and 13 controls) when using [³H]glutamate and the selective NMDA antagonist [³H]CGP39653. On the contrary, Cummins *et al.* (1990) showed reduced [³H]glutamate binding in hippocampus from 10 abstinent alcoholics.

Different reasons could explain the discrepancies between those data and our study. Clinical variations related to co-morbidity such sudden death, cirrhosis, acute hypoxia or pneumonia could eventually alter glutamate binding (Piggott *et al.* 1992; Freund & Anderson 1996; Ridge *et al.* 2008). In our sample, we did not find an influence of liver fibrosis (a necropsy finding without previous clinical manifestations), supporting the study of Ridge *et al.* (2008) that suggests that hepatopathy, but not alcohol *per se*, could be the cause of changes in NMDA receptors.

Another possible explanation is related to the ligand used. MK-801 binds inside the previously opened ion channel of the NMDA receptor and it has been demonstrated that ethanol diminishes [³H]MK801 binding only in the absence of glycine, a modulator of channel aperture (Freund & Anderson 1996). Since we used intact, fresh-frozen brain tissue, it is possible that glycine present in our sections might interfere with the binding of [³H]MK801 and therefore mask putative alterations present in samples from chronic alcohol consumers.

It might be considered that ethanol could interact with NMDA receptors in a manner not measurable by auto-radiographic techniques. For instance, a decrease in specific NMDA receptor subunits could eventually be compensated by an accelerated synthesis of mRNA encoding the proteins involved. Finally, it could be speculated that ethanol modifies other cellular events, such as the migration of receptor subunits from extrasynaptic sites in the plasmatic membrane to synaptic functional loci, or receptor assembly, among others.

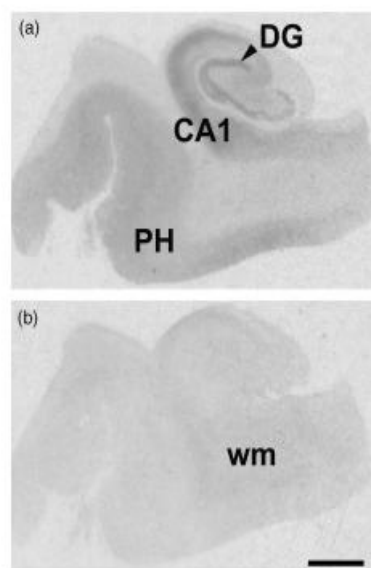


Figure 1 Autoradiographic images showing the total (a) and non-specific (b) binding of [³H]MK801 in the hippocampus of a control subject. CA1 = CA1 field, DG = dentate gyrus, PH = parahippocampal gyrus, wm = white matter. Bar = 4 mm

Table 1 Densities of [³H]MK 801 binding in controls and alcohol consumers.

Data are mean densities of specific [³H]MK 801 binding expressed in fmol/mg tissue (mean ± SD). No statistically significant differences were found among the different groups.

Group	Frontal cortex	Dentate gyrus	CA1
Controls	71.62 ± 17.89 (n = 16)	147.83 ± 34.94 (n = 15)	173.18 ± 49.65 (n = 15)
Alcohol consumers (AC) all	82.94 ± 20.57 (n = 15)	139.26 ± 38.97 (n = 13)	191.66 ± 70.19 (n = 13)
>80 g/day consumers	81.16 ± 16.25 (n = 11)	131.28 ± 36.91 (n = 11)	187.18 ± 75.94 (n = 11)
40–80 g/day consumers	87.86 ± 32.39 (n = 4)	183.14 ± 6.92 (n = 2)	216.29 ± 4.61 (n = 2)
Abstinent	79.71 ± 4.35 (n = 3)	124.36 ± 18.93 (n = 4)	165.75 ± 42.56 (n = 4)
Non-abstinent	83.75 ± 23.05 (n = 12)	145.88 ± 44.53 (n = 9)	203.17 ± 78.90 (n = 9)

Thus, a number of fundamental questions remain open, and further studies on a greater number of human brain samples are necessary. Combined studies of histological assessment with autoradiography with different ligands and *in situ* hybridization can yield information on the effects of chronic ethanol consumption on functional mature NMDA receptors and some of their subunits.

Acknowledgements

We thank Dr. Félix Cruz-Sánchez at the Brain Bank of the Hospital Clinic (Barcelona) in the preparation and pathological examination of human brain material, and the staff of the Anatomical Phorensic Institute of Barcelona. We wish to thank Dr. Emili Corbella for statistical analysis.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1 Summary of cases.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Cummins JT, Sack M, von Hungen K (1990) The effect of chronic ethanol on glutamate binding in human and rat brain. *Life Sci* 47:877–882.
- Dodd PR, Thomas GJ, Harper CG, Kril JJ (1992) Amino acid neurotransmitter receptor changes in cerebral cortex in alcoholism: effect of cirrhosis of the liver. *J Neurochem* 59:1506–1515.
- Freund G, Anderson KJ (1996) Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1165–1172.
- Freund G, Anderson KJ (1999) Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus, and cerebellar vermis of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1–6.
- Hammarberg A, Jayaram-Lindström N, Beck O, Franck J, Reid MS (2009) The effects of acamprosate on alcohol-cue reactivity and alcohol priming in dependent patients: a randomized controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* 205:53–62.
- Michaelis EK, Freed WJ, Galton N, Foye J, Michaelis ML, Phillips I, Kleinmann JE (1990) Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem Res* 15:1055–1063.
- Michaelis EK, Michaelis ML, Freed WJ, Foye J (1993) Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes during chronic alcohol intake. *Alcohol Alcohol* 2:377–381.
- Piggott MA, Perry EK, Saghal A, Perry RH (1992) Examination of parameters influencing [³H]MK-801 binding in postmortem human cortex. *J Neurochem* 58:1001–1008.
- Ridge J, Ho A, Innes D, Dodd P (2008) The expression of NMDA receptor subunit mRNA in human chronic alcoholics. *Ann N Y Acad Sci* 1139:10–19.

BIBLIOGRAFIA

Acheson SK, Stein RM, Swartzwelder HS. Impairment of semantic and figural memory by acute ethanol: age-dependent effects. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998;22:1437.

Acosta G, Hasenkamp W, Daunais JB, Friedman DP, Grant KA, Hemby SE. Ethanol self-administration modulation of NMDA receptor subunit and related synaptic protein mRNA expression in prefrontal cortical fields in cynomolgus kidneys. *Brain Res* 2010; 1318: 144-154.

Adams RD, Victor M. Diseases of the nervous system due to nutritional deficiency. En: Adams RS, Victor M (Eds). *Principles of Neurology*. 4th ed. Mc Graw-Hill Information Services Company, New York 1989; 820-845.

Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989; 12: 366-375.

Albin RL, Greenamyre JT. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology* 1992; 42: 733-738.

Al-Hallaq RA, Jarabek BR, Fu Z, Vicini S, Wolfe BB, Yasuda RP. Association of NR3A with the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* 2002; 62(5): 1119-1127.

Allgaier C. Ethanol sensitivity of NMDA receptors. *Neurochem Int*. 2002; 41(6):377-82

Al Qatari M, Khan S, Harris B, Littleton J. Acamprosate is neuroprotective against glutamate-induced excitotoxicity when enhanced by ethanol withdrawal in neocortical cultures of fetal rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1276-1283.

Altamura CA, Mauri MC, Ferrara A, Moro AR, D'Andrea G, Zamberlan F. Plasma and platelet excitatory amino acids in psychiatry disorders. *Am J Psychiatr* 1993; 150: 1731-1733.

Alvestad RM, Yamamoto T, Browning MD. Effects of ethanol of phosphorylation state and subcellular distribution of NMDA receptors in rat hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 17.

Anders DL, Blevins T, Sutton G, Swope S, Chandler LJ, Woodward JJ. Fyn tyrosine kinase reduces the ethanol inhibition of recombinant NR1/NR2A but not NR1/NR2B NMDA receptors expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 1999; 72: 1389-1393.

Anders DL, Blevins T, Smothers CT, Woodward JJ. Reduced ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors by deletion of the NR1 C0 domain or overexpression of alpha-actinin-2 proteins. *J Biol Chem* 2000; 275: 15019-15024.

Anji A, Kumari M. A cis-acting region in the N-methyl-D-aspartate R1 3'-UTR region interacts with the novel RNA binding protein beta subunit of alpha glucosidase II and annexin A1-effect of chronic ethanol exposure *in vivo*. *Eur J Neurosci* 2011; 34: 1200-1211.

Antúnez E, Estruch R, Cardenal C, Nic0olás JM, Fernández-Sola J, Urbano-Marquez A. Usefulness of CT and MR imaging in the diagnosis of acute Wernicke's encephalopathy. *Am J Roentgenol* 1998; 171(4): 1131-1134.

Arendt T, Henning D, Gray JA, Marchbanks R. Loss of neurons in the rat basal forebrain cholinergic projection system after prolonged intake of ethanol. *Brain res Bull* 1988; 21: 563-569.

Aroor AR, James T, Jackson DE, Shukla SD. Differential changes in MAP kinases, histone modifications, and liver injury in rats acutely treated with ethanol. *Alcohol Cli Exp Res* 2010; 34: 1543-1551.

Baker KG. Neuronal loss in functional zones of the cerebellum of chronic alcoholics with and without Wernicke's encephalopathy. *Neuroscience*. 1999;91:429

Bales K. The value and limitations of transgenic mouse models used in drug discovery for Alzheimer's disease: an update. *Expert Opin. Drug Discov*. 2012; 7(4):281-297

Barnes JM, Henley JM. Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. *Prog Neurobiol* 1992; 39: 113-135.

Bauer J, Pedersen A, Scherbaum N, Bening J, Patschke J, Kugel H, Heindel W, Arolt V, Ohrmann P. Craving in alcohol-dependent patients after detoxification is related to glutamatergic dysfunction in the nucleus accumbens and the anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology*. 2013 Jul;38(8):1401-1408

Bashir ZI, Bortolotto ZA, Davies CH, Berretta N, Irving Aj, Seal AJ. Induction of LTP in the hippocampus needs synaptic activation of glutamate metabotropic receptors. *Nature (Lond)* 1993; 363: 347-350.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992; 31: 119-130.

Becker HC, Veatch LM, Diaz-Granados JL. Repeated ethanol withdrawal experience selectively alters sensitivity to different chemoconvulsant drugs in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1998; 139: 145-153.

Ben-Ari Y, Aniksztejn L, Bregestovski P. Protein kinase C modulation of NMDA currents: an important link for LTP induction. *Trends Neurosci* 1992; 15: 333-339.

Berild D, Hasselbach H. Survival after a blood alcohol of 1127 mg/dl. *Lancet* 1981; 2: 363.

Bienkowski P, Stefanski R, Kostowski W. Competitive NMDA receptor antagonist, CGP 40116, substitutes for the discriminative stimulus effects of ethanol. *Eur J Pharmacol* 1996; 314: 277-280.

Blass JP, Gibson GE. Abnormality of the thiamine-requiring enzyme in patients with Wernicke-Korsakoff syndrome. *N Engl J Med* 1977; 297: 1367-1470).

Blevins T, Mirshahi T, Chandler LJ, Woodward JJ. Effects of acute and chronic ethanol exposure on heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* 1997; 69: 2345-2354.

Bliss TVP, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature (Lond)* 1993; 361: 31-39.

Bradley J, Carter SR, Rao VR, Wang J, Finkbeiner S. Splice variants of the NR1 subunit differentially induce NMDA receptor-dependent gene expression. *J Neurosci* 2006; 26: 1065-1076.

Breese CE, Freedman R, Leonard SL. Glutamate receptor subtype expression in human postmortem brain tissue from schizophrenics and alcohol abusers. *Brain Res* 1995; 674: 82-90.

Brooks PJ, Lipsky RH. Future direction in alcoholism research: Genomic and Gene transfer. *Alcohol Res Health* 2000; 24: 189-192.

Buller AL, Larson HC, Morrisett RA, Monaghan DT. Glycine modulates ethanol inhibition of heteromeric N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Mol Pharmacol* 1995; 48: 717-723.

Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppersberg JP, Günther W, Seeburg PH, Sakmann B. Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 1992; 257: 1415-1419.

Butterfield A, Pocernich ChB. The glutamatergic system and Alzheimer's disease. *CNS Drugs* 2003; 17 (9): 641-652.

Calabresi P, De Murtas M, Mercuri NB, Bernardi G. Chronic neuroleptic treatment D2 dopamine receptor supersensitivity and striatal glutamatergic transmission. *Ann Neurol* 1992 ; 31 : 366-373.

Calton JL, Wilson WA, Moore SD. Reduction of voltage-dependent currents by ethanol contributes to inhibition of NMDAR-mediated excitatory synaptic transmission. *Brain Res.* 1999;816:142

Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ. Iontropic glutamate receptor clustering and membrane trafficking. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 8.

Carpenter-Hyland EP, Woodward JJ, Chandler LJ. Chronic ethanol induces synaptic but not extrasynaptic targeting of NMDARs. *J Neurosci*. 2004;24:7859

Carroll RC, Zukin RS. NMDA-receptor trafficking and targeting: implications for synaptic transmission and plasticity. *Trends Neurosci* 2002; 25: 571-577.

Cathala L, Misra C, Cull-Candy S. Developmental profile of the changing properties of NMDA receptors at cerebellar mossy fiber-granule cell synapses. *J Neurosci*. 2000; 20:5899-5905.

Cebers G, Ceberé A, Zharkovsky A, Liljequist S. Glycine does not reverse the inhibitory actions of ethanol on NMDA receptor functions in cerebellar granule cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354: 736-745.

Chandrasekar R. Alcohol and NMDA receptor: current research and future direction. *Front Mol Neurosci* 2013; 6: 1-27

Charness ME, Simon RP, Greenberg DA. Ethanol and the nervous system. *N Engl J Med* 1989; 321: 442-454.

Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tant T, Kavalali E, Bezprozvanny I, Herz J. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. *J Neurosci Lett*. 2005, 25(36):8209-8216

Choi DW. Bench to bedside: the glutamate connection. *Science* 1992; 258: 241-243.

Christensen T, Jorgensen MB, Diemer NH. Impairment of Fos protein formation in the rat infarct borderzone by MK-801, but not by NBQX. *Acta Neurol Scand* 1993; 87: 510-515.

Chu B, Anantharam V, Treistman SN. Ethanol inhibition of recombinant heteromeric NMDA channels in the presence and absence of modulators. *J Neurochem* 1995; 65: 140-148.

Cloninger CR. Neurogenetic adaptative mechanisms in alcoholism. *Science* 1987; 236: 410-416.

Cooke SF, Bliss TV. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006; 129(7): 1659-73.

Crabbe JC, Kendler K, Hitzemann R. Modeling the Diagnostic Criteria for Alcohol Dependence with Genetic Animal Models. *Curr Top Behav Neurosci* 2013 ; 13: 187–221.

Crary JF, Shao CY, Mirra SS, Hernandez AI, Sacktor TC. Atypical protein kinase C in neurodegenerative disease I. PKMzeta aggregates with limbic neurofibrillary tangles and AMPA receptors in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2006; 65(4): 319-26.

Criswell HE, et al. Macrokinetic analysis of blockade of NMDA-gated currents by substituted alcohols, alkanes and ethers. *Brain Res.* 2004;1015:107

Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11:327-335.

Cummins JT, Sack M, von Hungen K. The effect of chronic ethanol on glutamate binding in human and rat brain. *Life Sci.* 1990; 47(19): 877-882.

Dani JA, Mayer ML. Structure and function of glutamate and nicotinic acetylcholine receptors. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5: 310-317.

Darstein MB, Landwehrmeyer GB, Feuerstein TJ. Changes in NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain following withdrawal from forced long-term ethanol intake. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361(2): 206-213.

Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, et-al. Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature.* 1998; 393:377-81.

Davidson MD, Wilce P, Shanley BC. Increased sensitivity of the hippocampus in ethanol-dependent rats to toxic effect of N-methyl-D-aspartic acid in vivo. *Brain Res* 1993; 606: 5-9.

Davis M, Rainnie D, Cassell M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. *Trends Neurosci* 1994; 17: 208-214.

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitrid oxide. *Ann Neurol* 1992; 32: 297-311.

De la Monte SM. Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics: a pathological study. *Arch Neurol* 1988; 45: 990-992.

De la Monte SM, Krill JJ. Human alcohol-related neuropathology. *Acta Neuropathol* 2014; 127: 71-90

Devaud LL, Morrow AL. Gender-selective effects of ethanol dependence on NMDA receptor subunit expression in cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus. *Eur J Pharmacol.* 1999 Mar 26;369(3):331-4.

Devaud LL, Alele P. Differential effects of chronic ethanol administration and withdrawal on gamma-aminobutyric acid type A and NMDA receptor subunit proteins in male and female rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(6): 957-965.

De Witte P. Imbalance between neuroexcitatory and neuroinhibitory amino acids causes craving for ethanol. *Addict Behav* 2004; 29(7): 1325-1339.

Diana M, Rossetti ZL, Gessa G. Rewarding and aversive effects of ethanol: interplay of GABA, glutamate and dopamine. *Alcohol Alcohol Suppl* 1993; 2: 315-319.

Dickinson A, Wood N, Smith JW. Alcohol seeking by rats: action or habit? *Q J Exp Psychol B.* 2002;55:331

Dildy JE, Leslie SW. Ethanol inhibits NMDA-induced increases in free intracellular Ca²⁺ in dissociated brain cells. *Brain Res* 1989; 499: 383-387.

Dingledine R, Boland LM, Chamberlin NL, Kawasaki K. Amino acid receptors and uptake systems in the mammalian central nervous system. *CRC Crit. Rev. Neurobiol.* 1988; 4: 1-96.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* 1999;51 (1): 7–61.

Dodd PR, Thomas GJ, Harper CG, Kril JJ. Amino acid neurotransmitter receptor changes in cerebral cortex in alcoholism: effect of cirrhosis of the liver. *J Neurochem* 1992; 59: 1506-1515.

Domart MC, Benyamina A, Lemoine A, Bourgain C, Blecha L, Debuire B, Reynaud M, Saffroy R. Association between a polymorphism in the promoter of a glutamate receptor subunit gene (*GRIN2A*) and alcoholism. *Addict Biol.* 2012 Jul;17(4):783-5.

Du X, Elberger AJ, Matthews DB, Hamre KM. Heterozygous deletion of NR1 subunit of the NMDA receptor alters ethanol-related behaviors and regional expression of NR2 subunits in the brain. *Neurotoxicol Teratol* 2012; 34(1):177-86.

Dure SL IV, Young AB, Penney JB. Excitatory amino acid binding sites in the caudate nucleus and frontal cortex of Huntington's disease. *Ann Neurol* 1991; 30: 785-793.

Duval D, Roome N, Gauffeny C, Nowicki JP, Scatton B. SL 82.0715, an NMDA antagonist acting at the polyamine site, does not induce neurotoxic effects on rat cortical neurons. *Neurosci Lett* 1992; 137: 193-197.

Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 998-1040.

Ehlers MD, Tingley WG, Huganir RL. Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 1995; 269: 1734-1737.

Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Huganir RL. Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 1996; 84:745-55.

Enoch MA, Goldman D. The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Curr Psychiatry Rep* 2001; 3:144–151.

Erreger K, Geballe MT, Kristensen A, Chen PE, Hansen KB, Lee CJ, et-al. Subunit-specific agonist activity at NR2A-, NR2B-, NR2C-, and NR2D-containing N-methyl-D-aspartate glutamate receptors. *Mol Pharmacol*. 2007; 72:907-920.

Everitt BJ, Robbins TW. Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*. 2005;8:1481.

Fadda F, Rossetti ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*.1998;56:385.

Ferrer I, Fabregues I, Rairiz J, Galofré E. Decreased numbers of dendritic spines on cortical pyramidal neurons in human chronic alcoholism. *Neurosc Lett* 1986; 69: 115-119.

Ferrer I, Fabregues I, Pineda M, Gracia I, Ribalta T. A Golgi study of cerebellar atrophy in human chronic alcoholism. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1984; 10: 245-253.

Fink K, Gothert M. Both ethanol and ifenprodil inhibit NMDA-evoked release of various neurotransmitters at different, yet proportional potency: potential relation to NMDA receptor subunit composition. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354: 312-319.

Flatscher-Bader T, van der Brug M, Hwang JW, Gochee PA, Matsumoto I, Niwa S, Wilce PA. Alcohol-responsive genes in the frontal cortex and nucleus accumbens of human alcoholics. *J Neurochem*. 2005 Apr; 93(2): 359-70.

Flora SJ, Gautam P, Kushwaka P. Lead and ethanol co-exposure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats. *Alcohol Alcohol* 2012; 47: 92-101.

Floyd DW, Jung KY, McCool BA. Chronic ethanol ingestion facilitates N-methyl-D-aspartate receptor function and expression in rat lateral/basolateral amygdale neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307(3): 1020-1029.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment differentially regulates NMDA receptor subunit mRNA expression in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 29: 99-106.

Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol-mediated up-regulation of the N-methyl-D-aspartate receptor polypeptide subunits in mouse cortical neurons in culture. *J Biol Chem* 1996; 271: 13297-13299.

Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the frontal cortex of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20 (7): 1165-1172.

Freund G, Anderson KJ. Glutamate receptors in the cingulate cortex, hippocampus, and cerebellar vermis of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23 (1): 1-6

Galofré E, Ferrer I, Fabregues I, López-Tejedo D. Effects of prenatal ethanol exposure on dendritic apines of layer V pyramidal neurons in the somatosensory cortex of the rat. *J Neurol Sci* 1897; 81: 185-195.

Gasic GP, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 507-536.

Gass JT, Olive MF. Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem Pharmacol* 2008; 75:218–265.

Gatch MB, Wallis CJ, Lal H. Effects of NMDA antagonists on ethanol-withdrawal induced “anxiety” in the elevated plus maze. *Alcohol* 1999; 19: 207-211.

Givens B, MacMahon K. Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* 1995; 688:27-33.

Goebel DJ, Poosch MS. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous mRNA levels of NR1Com, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999; 69:164-170.

Gold R, Lington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 2006; 129: 1953-71.

Goldman D, Ducci F. Deconstruction of vulnerability to complex diseases: enhanced effect sizes and power of intermediate phenotypes. *Scientific World J* 2007; 7:124–130

Goldstein DB. *Pharmacology of alcohol.* Oxford University Press, New York 1983.

Gonzales RA, Woodward JJ. Ethanol inhibits N-methyl-D-aspartate-stimulated [3H]norepinephrine release from rat cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 253: 1138-1144.

Gonzalez LP, Veatch LM, Ticku MK, Becker HC. Alcohol withdrawal kindling: mechanisms and implications for treatment. *Alcohol Cli Exp Res* 2001; 25: 197S-201S.

Grant KA, Valverius P, Hudspith M, Tabakoff B. Ethanol withdrawal seizures and the NMDA receptor complex. *Eur J Pharmacol* 1990; 176: 289-296.

Greenamyre JT, Young AB. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1989; 10: 593-602.

Greenamyre JT, O'Brien CF. N-methyl-D-aspartate antagonists in the treatment of Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1991; 48: 977-981.

Grosshans DR, Browning MD. Protein kinase C activation induces tyrosine phosphorylation of the NR2A and NR2B subunits of the NMDA receptor. *J Neurochem* 2001; 76: 737-744.

Grover CA, Frye GD, Griffith WH. Acute tolerance to ethanol inhibition of NMDA-mediated EPSPs in the CA1 region of the rat hippocampus. *Brain Res.* 1994;642:70.

Gu M, Zahr NM, Spielman DM, Sullivan EV, Pfefferbaum A, Mayer D. Quantification of glutamate and glutamine using constant-time point-resolved spectroscopy at 3 T. *NMR Biomed* 2012; 26:164–172.

Gulya K, Grant KA, Valverius P, Hoffman PL, Tabakoff B. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991; 547: 129-134.

Hall W, Zador D. The alcohol withdrawal syndrome. *Lancet.* 1997;349:1897–1900.

Hamberger A, Van Gelder NM. Metabolic manipulation of neural tissue to counter the hypersynchronous excitation of migraine and epilepsy. *Neurochem Res* 1993; 18: 503-509.

Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 2002; 5: 405-414.

Hardy PA, Chen W, Wilce PA. Chronic ethanol exposure and withdrawal on NMDA receptor subunit and splice variant mRNA expression in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1999; 819: 33-39.

Harper CG, Kril JJ. Brain atrophy in chronic alcoholic patients: a quantitative pathological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1985; 48: 211-217.

Harper CG, Giles M, Finaly-Jones R. Clinical signs in the Wernicke-Korsakoff complex: a retrospective analysis of 131 cases diagnosed at necropsy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986; 49: 341-345.

Harper C, Kril J, Daly J. Are we drinking our neurones away. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 1987;294:534.

Harper CG, Kril J, Daly J. Does a “moderate” alcohol intake damage the brain? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 909-913.

Harper C, Corbett D. Changes in the basal dendrites of cortical pyramidal cells from alcoholic patients—a quantitative Golgi study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1990;53:856.

Harrison PJ, Barton AJ, Najlerahim A, McDonald B, Pearson RC. Increased muscarinic receptor messenger RNA in Alzheimer's disease temporal cortex demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 1991; 1: 15-21.

Haugbol SR, Ebert B, Ulrichsen J. Upregulation of glutamate receptor subtypes during alcohol withdrawal in rats. *Alcohol Alcohol* 2005; 42(2): 89-95.

Hawkins LM, Chazot PL, Stephenson FA. Biochemical evidence for the co-association of three N-methyl-D-aspartate (NMDA) R2 subunits in recombinant NMDA receptors. *J Biol Chem* 1999; 274: 27211-27218.

Heath AC, Bucholz KK, Madden PA, Dinwiddie SH, Slutske WS, Bierut LJ, Statham DJ, Dunne MP, Whitfield JB, Martin NG. Genetic and environmental contributions to alcohol dependence risk in a national twin sample: consistency of findings in women and men. *Psychol Med* 1997; 27:1381-96.

Hemby SE, O'connor JA, Acosta G, Floyd D, Anderson N, McCool BA, Friedman D, Grant KA. Ethanol-induced regulation of GABA-A subunit mRNAs in prefrontal fields of cynomolgus monkeys. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Dec;30(12):1978-85.

Hendrickson AW, et al. Aberrant synaptic activation of N-methyl-D-aspartate receptors underlies ethanol withdrawal hyperexcitability. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;321:60

Hermann N, Chau S, Kircanski I, Lanctot KL. Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review. *Drugs* 2011; 71: 2031-65

Hillbom M, Pieninkeroinen I, Leone M. Seizures in alcohol-dependent patients: epidemiology, pathophysiology and management. *CNS Drugs* 2003; 17(14): 1013-1030.

Hillemarcher T. Biological mechanisms in alcohol dependence. News perspectives. *Alcohol Alcohol* 2011; 46: 224-230.

Hindmarch I, Kerr JS, Sherwood N. The effects of alcohol and other drugs on psychomotor performance and cognitive function. *Alcohol Alcoholism* 1991; 26: 71-79.

Hinton DJ, Lee MR, Jacobson TL, Mishra PK, Frye MA, Mrazek DA et al. Ethanol withdrawal-induced brain metabolites and the pharmacological effects of acamprosate in mice lacking ENT1. *Neuropharmacology* 2012; 62:2480–2488.

Hitchcott PK, Bonardi CM, Phillips GD. Enhanced stimulus-reward learning by intra-amygdala administration of a D3 dopamine receptor agonist. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 133: 240-248.

Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B. NMDA receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem* 1989; 52:1937-1940.

Hoffman PL, Tabakoff B. Ethanol sedative hypnotics and glutamate receptor function in brain and cultured cells. *Alcohol & Alcoholism Suppl. 2* 1993; 345-351

Hoffman PL, Iorio KR, Snell LD, Tabakoff B. Attenuation of glutamate-induced neurotoxicity in chronically ethanol-exposed cerebellar granule cells by NMDA receptor antagonists and ganglioside GM1. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19: 721-726.

Hoffman PL. NMDA receptors in alcoholism. *Int Rev Neurobiol* 2003; 56:35-82.

Honse Y. Sites in the fourth membrane-associated domain regulate alcohol sensitivity of the NMDAR. *Neuropharmacology*. 2004;46:647.

Hu Xs, Follesa P, Ticku MK. Chronic ethanol treatment produces a selective up-regulation of the NMDA receptor subunit gene expression in mammalian cultured cortical neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 36: 211-218.

Huggins DJ, Grant GH. The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model*. 2005; 23(4): 381-8

Hugon J, Tabaraud F, Rigaud M, Vallat JM, Dumas M. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in leukocytes of patients with motor neuron disease. *Neurology* 1989; 39: 956-958.

Ikeda K, Nagasawa M, Mori H, Araki K, Sakimura K, Watanabe M, Inoue Y, Mishina M. Cloning and expression of the epsilon 4 subunit of the NMDA receptor channel. *FEBS Lett* 1992; 313: 34-38.

Imbimbo BP. Why did Tarenflurbil fail in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 2009; 17: 757-60.

Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 219-228.

Iorio KR, Tabakoff B, Hoffman PL. Chronic exposure of cerebellar granule cells to ethanol results in increased N-methyl-D-aspartate receptor function. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 1142-1148.

Izquierdo I. Role of NMDA receptors in memory. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 12: 128-129.

Jatzke C, Watanabe J, Wollmuth LP. Voltage and concentration dependence of Ca²⁺ permeability in recombinant glutamate receptor subtypes. *J Physiol*. 2002; 538:25-39

Jin C, Woodward JJ. Effects of 8 different NR1 splice variants on the ethanol inhibition of recombinant NMDA receptors. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006; 30(4):673-9.

Jin Z, Bhandage AK, Bazov I, Kononenko O, Bakalkin G, Korpi ER, Birnir B. Selective increases of AMPA, NMDA, and kainate receptor subunit mRNAs in the hippocampus and orbitofrontal cortex but not in prefrontal cortex of human alcoholics. *Front Cell Neurosci*. 2014; Jan 8: 1-10.

Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature (Lond.)* 1987; 325: 529-531.

Johnson BA, Ait-Daoud N, Bowden CL, DiClemente CC, Roache JD, Lawson K, Javors MA, Ma JZ. Oral topiramate for treatment of alcohol dependence: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003 May 17; 361(9370):1677-85.

Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR. Nitrid oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 1717-1724.

Kalant H, LeBlanc AE, Gibbins RJ. Tolerance to, and dependence on, some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol Rev* 1971; 23: 135-191.

Kamboj RK, Schoepp DD, Nutt S, Sheckter L, Korezak B, True RA, Rampersad V, Zimmerman DM, Wosnick MA. Molecular cloning, expression and pharmacological characterization of humEAA1, a human kainate receptor subunit. *J Neurochem* 1994; 62: 1-9

Karhunen PJ, Erkinjuntti T, Laippala P. Moderate alcohol consumption and loss of cerebellar Purkinje cells. *Br J Med J* 1994; 308: 1663-1667.

Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews. Neuroscience* 2007; 8(11): 844-58.

Kendler KS, Heath AC, Neale MC, Kessler RC, Eaves LJ. A population-based twin study of alcoholism in women. *JAMA* 1992; 14; 268:1877-82.

Kim JH, Park M, Yang SY, Jeong BS, Yoo HJ, Kim JW, Chung JH, Kim SA. Association study of polymorphisms in N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunits (GRIN2B) gene with Korean alcoholism. *Neurosci Res.* 2006 Oct;56(2):220-3. Epub 2006 Sep 5.

King MA, Hunter BE, Walker DW. Alterations and recovery of dendritic spine density in rat hippocampus following long-term ethanol ingestion. *Brain Res* 1988; 459: 381-385.

Kirstein SL, Davidson KL, Ehringer MA, Sikela JM, Erwin VG, Tabakoff B. Quantitative trait loci affecting initial sensitivity and acute functional tolerance to ethanol-induced ataxia and brain camp signalling in BXD recombinant inbred mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302: 1238-1245.

Kitai ST, Shepard PD, Callaway JC, Scroggs R. Afferent modulation of dopamine neuron firing patterns. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 690-697.

Klausnitzer J, Kulla A, Manahan-Vaughan D. Role of the group III metabotropic glutamate receptor in LTP, depotentiation and LTD in dentate gyrus of freely moving rats. *Neuropharmacology* 2004; 46: 160-170.

Knapp DJ, Braun CJ, Duncan GE, Qian Y, Fernandes A, Crews FT, Breese GR. Regional specificity of ethanol and NMDA action in brain revealed with FOS-like immunohistochemistry and differential routes of drug administration. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1662-1672.

Kolb JE, Trettel J, Levine ES BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse.* 2005 Jan; 55(1): 52-7.

Koltchine V, Anantharam V, Wilson A, Bayley H, Treistman SN. Homomeric assemblies of NMDAR1 splice variants are sensitive to ethanol. *Neurosci Lett* 1993; 152; 13-16.

Kornhuber J, Weller M, Riederer P. Glutamate receptor antagonists for neuroleptic malignant syndrome and akinetic hyperthermic Parkinsonian crisis. *J Neural Transm [P-D Sect]* 1993; 6: 63-72.

Korsten MA, Lieber CS. Nutrition in the Alcohol. *Med Clin North Am* 1979; 63: 963-972.

Kotslinka J. NMDA antagonists inhibit the development of ethanol dependence in rats. *Pol J Pharmacol* 2001; 53: 47-50.

Kotlinska J, Biala G, Rafalski P, Bochenski M, Danysz W. Effect of neramexane on ethanol dependence and reinforcement. *Eur J Pharmacol* 2004; 503(1-3): 95-98.

Kranzler HR, Van Kirk J. Efficacy of naltrexone and acamprosate for alcoholism treatment: a meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 1335-1341.

Kranzler HR, Gelernter J, Anton RF, Arias AJ, Herman A, Zhao H, Burian L, Covault J. Association of markers in the 3' region of the GluR5 kainate receptor subunit gene to alcohol dependence. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009 May; 33(5): 925-30.

Kreutz MR, Böckers TM, Bockmann J, Seidenbecher CI, Kracht B, Vorwerk CK, et al. Axonal injury alters alternative splicing of the retinal NR1 receptor: the preferential expression of the NR1b isoforms is crucial for retinal ganglion cell survival. *J Neurosci*. 1998; 18:8278-8291.

Krupitsky EM. Effect of memantine on cue-induced alcohol craving in recovering alcohol-dependent patients. *Am J Psychiatry*. 2007;164:519.

Krystal JH. Altered NMDA glutamate receptor antagonist response in recovering ethanol-dependent patients. *Neuropsychopharmacology*. 2003;28:2020.

Kumari M, Ticku MK. Ethanol and regulation of the NMDA receptor subunits in fetal cortical neurons. *J Neurochem*. 1998; 70(4): 1467-1473.

Kumari M. Differential effects of chronic ethanol treatment on N-methyl-D-aspartate R1 splice variants in fetal cortical neurons. *J Biol Chem*. 2001; 276 (32): 29764-29771.

Kumari M, Anji A. And old story with a new vist: Do NMDAR1 binding protein regulate expression of the NMDAR1 receptor in the presence of alcohol? *Ann NY Acad Sci* 2005; 1053: 311-318.

Kuner T, Schoepfer R, Korpi ER. Ethanol inhibits glutamate-induced currents in heteromeric NMDA recpetor subtypes. *Neuroreport* 1993; 5: 297-300.

Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M. Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature* 1992; 358: 36-41.

Lai CC, Chang MC, Lin HH. Acute tolerance to ethanol inhibition of NMDA-induced responses in rat rostral ventrolateral medulla neurons. *J Biomed Sci.* 2004;11:482.

Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 1997; 18: 493-503.

Laurie DJ, Putzke J, Zieglansberger W, Seeburg PH, Tolle TR. The distribution of splice variants of the NMDAR1 subunit mRNA in adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 32: 94-108.

Lê AD, Kalant H. Influence of intoxicated practice on the development of acute tolerance to the motor impairment effect of ethanol. *Psychopharmacology (Berl)* 1980; 106: 572-576.

LeBlanc AE, Gibbins RJ, Kalant H. Behavioral augmentation of tolerance to ethanol in the rat. *Psychopharmacologia* 1973; 30: 117-122.

Lee I, Kesner RP. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. *Nat Neurosci* 2002; 5: 162-168.

Leo MA, Lieber CS. Hepatic fibrosis after long-term administration of ethanol and moderate vitamin A supplementation in the rat. *Hepatology* 1983 Jan-Feb;3(1):1-11.

Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor mediated synaptic currents. *Nature*. 1990; 346:565-567.

Li Q, Wilson WA, Swartzwelder HS. Differential effect of ethanol on NMDA EPSCs in pyramidal cells in the posterior cingulate cortex of juvenile and adult rats. *J Neurophysiol*. 2002;87:705

Li HF, Mochly-Rosen D, Kendig JJ. Protein kinase Cgamma mediates ethanol withdrawal hyper-responsiveness of NMDA receptor currents in spinal cord motor neurons. *Br J Pharmacol* 2005; 144 (3): 301-307.

Li Y. Establishment of experimental models for Alzheimer's disease research. *Int J Neurosci*. 2013; 123(12): 823-31

Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med* 1988; 319: 1639-1650.

Liljequist S. The competitive NMDA receptor antagonist, CGP 39551, inhibits ethanol withdrawal seizures. *Eur J Pharmacol* 1991; 192: 197-198.

Lima-Landman MT, Albuquerque EX. Ethanol potentiates and blocks NMDA-activated single-channel currents in rat hippocampal pyramidal cells. *FEBS Lett* 1989; 247: 61-67.

Lipton SA. Molecular mechanisms of trauma-induced neuronal degeneration. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 588-596.

Logan SM, Rivera FE, Leonard JP. Protein kinase C modulation of recombinant NMDA receptor currents: roles for the C-terminal C1 exon and calcium ions. *J Neurosci* 1999; 19(3): 974-986.

Losonczy A, Somogyi P, Nusser Z. Reduction of excitatory postsynaptic responses by persistently active metabotropic glutamate receptors in the hippocampus. *J Neurophysiol* 2003; 89 (4): 1910-1919.

Lovinger DM, White G, Weight F. Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 1989; 243: 1721-1724.

Lovinger DM, White G, Weight FF. NMDAR-mediated synaptic excitation selectively inhibited by ethanol in hippocampal slice from adult rat. *J Neurosci.* 1990;10:1372.

Lovinger DM. Excitotoxicity and alcohol-related brain damage. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17:19

Lyuboslavsky P, French A, Le P, Wyatte K, Thiel WH, Marchan EM, et-al. Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Low CM, Mol Pharmacol.* 2003; 63:1212-22.

Mantz J, Cheramy A, Thierry AM, Glowinski J, Desmots JM. Anesthetic properties of riluzole (54274 RP), a new inhibitor of glutamate neurotransmission. *Anesthesiology* 1992; 76: 844-848.

Marco-Igual M. El sistema glutamatérgico (I): aspectos moleculares, farmacológicos y funcionales. *Med. Clin* 1995a; 104: 228-236.

Marco-Igual M. El sistema glutamatérgico (II): aspectos fisiopatológicos, clínicos y terapéuticos. *Med. Clin* 1995b; 105: 306-316.

Masood K, Wu C, Brauneis U, Weight FF. Differential ethanol sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *Mol Pharmacol.* 1994 Feb;45(2):324-9.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature (lond.)* 1984; 309: 261-263.

Mayer S, Harris BR, Gibson DA, Blanchard JA, Prendergast MA, Holley RC, Littleton J. Acamprosate, MK-801, and ifenprodil inhibit neurotoxicity and calcium entry induced by ethanol withdrawal in organotypic slice cultures from neonatal rat hippocampus. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;26: 1468-1478.

Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A, Liu J, Harris RA. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J Neurochem* 2002 May; 81(4): 802-13.

Maylor EA, Rabbitt PMA. Effect of practice and alcohol on performance of a perceptual motor task. *Q J Exp Psychology* 1987; 39: 777-795.

McCullen PA, Saint-Cyr JA, Carlen PL. Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting from chronic consumption and withdrawal. *J Comp Neurol* 1984; 225: 111-118.

McHugh T, Blum K, Tsien J, Tonegawa S, Wilson M. Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. *Cell* 1996; 87(7): 1339-49.

McLachlan RS. Suppression of spreading depression of Leao in neocortex by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Can J Neurol Sci* 1992; 19: 487-491.

Mei Q, Maharaj KT. Role of AP-1 in ethanol-induced N-methyl-D-aspartate receptor 2B subunit gene up-regulation in mouse cortical neurons. *J Neurochem* 2005; 95: 1332-1341.

Meldrum B. Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res Rev* 1993; 18: 293-314.

Merikangas KR, Stevens DE, Fenton B, Stolar M, O'Malley S, Woods SW, Risch N. Comorbidity and familiar aggregation of alcoholism and anxiety disorders. *Psychol Med* 1998; 28: 773-788.

Michaelis EK, Freed WJ, Galton N, Foye J, Michaelis ML, Phillips I, Kleinman JE. Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes from human alcoholics. *Neurochem Res* 1990; 15 (11): 1055-1063

Michaelis EK, Michaelis ML, Freed WJ, Foye J. Glutamate receptor changes in brain synaptic membranes during chronic alcohol intake. *Alcohol Alcohol* 1993; suppl. 2: 377-381.

Michaelis ML, Michaelis EK. Effects of ethanol on NMDA receptors in brain : possibilities for Mg(2+)-ethanol interactions. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 1069-1075.

Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* 1998; 54:369-415.

Mirshahi T, Woodward JJ. Ethanol sensitivity of heteromeric NMDARs: effects of subunit assembly, glycine and NMDAR1 Mg²⁺ - insensitive mutants. *Neuropharmacology* 1995; 34:347.

Mirshahi T. Intracellular calcium enhances the ethanol sensitivity of NMDARs through an interaction with the C0 domain of the NR1 subunit. *J Neurochem.* 1998;71:10957.

Miyakawa T, Yagi T, Kitazawa H, Yasuda M, Kawai N, Tsuboi K, Niki H. Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: relation to NMDA-receptor function. *Science* 1997; 278: 698-701.

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1989; 29: 365-402.

Monyer H, Burnashev, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 1994; 12: 529-540.

Mori H, Mishina M. Neurotransmitter receptors VIII. Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1219-1237.

Morimoto K, Sato M. NMDA receptor complex and kindling mechanisms. *Epilepsy Res Supl* 1992; 9: 297-305.

Möykkynen T, Korpi ER. Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012 Jul;111(1):4-13.

Nagy J, Muller F, Laszlo L. Cytotoxic effect of alcohol-withdrawal on a primary cultures of cortical neurones. *Drug Alcohol Depend* 2001; 61 (2): 155-162.

Nagy J, Kolok S, Dezso P, Boros A, Szombathelyi Z. Differential alterations in the expression of NMDA receptor subunits following chronic ethanol treatment in primary cultures of rat cortical and hippocampal neurones. *Neurochem Int* 2003; 42: 35-43.

Nagy J. The NR2B subtype of NMDA receptor: a potential target for the treatment of alcohol dependence. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004a; 3(3): 169-179.

Nagy J. Renaissance of NMDA receptor antagonists: do they have a role in the pharmacotherapy for alcoholism? *J drugs* 2004b; 7(4): 339-350.

Nagy J. NR2B subunit selective NMDA antagonists inhibit neurotoxic effect of alcohol-withdrawal in primary cultures of rat cortical neurones. *Neurochem Int.* 2004c: 44:17

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 1992; 258: 597-603.

Nakazawa K, Quirk MC, Chitwood RA, Watanabe M, Yeckel MF, Sun LD, Kato A, Carr CA, Johnston D, Wilson MA, Tonegawa S. Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 2002; 297: 211-218.

Naranjo CA, Sellers EM. Clinical assessment and pharmacotherapy of the alcohol withdrawal syndrome. *Recent development in alcoholism. Vol 4.* Galanter M (Ed). Plenum Publishing Corporation, NewYork 1986; 265-281.

Nelson TE, Ur CL, Gruol DL. Chronic intermittent ethanol exposure enhances NMDA-receptro-mediated synaptic responses and NMDA receptor expression in hippocampal CA1 region. *Brain Res* 2005; 23.

Newcomer JW, Krystal JH. NMDA receptor regulation of memory and behavior in humans. *Hippocampus* 2001; 11: 529-542.

Newlin DB, Thompson JB. Alcohol challenge with sons of alcoholics: a critical review and analysis. *Psychol Bull* 1990; 108: 383-402.

Ng SKC, Hauser WA, Brust JMC, Susser M. Alcohol consumption and withdrawal in new-onset seizures. *N Engl J Med* 1988; 319: 666-673.

Nicolás JM, Catafau AM, Estruch R, Lomeña FJ, Salamero M, Herranz R, Monforte R, Cardenal C, Urbano-Marquez A. Regional cerebral blood flow-SPECT in chronic alcoholism: relation to neuropsychological testing. *J Nucl Med* 1993; 34 (9): 1452-1459.

Nicolás JM, Estruch R, Salamero M, Orteu N, Fernandez-Sola J, Sacanella E, Urbano-Marquez A. Brain impairment in well-nourished chronic alcoholics is related to ethanol intake. *Ann Neurol* 1997; 41(5): 590-598.

Nicolas JM, Fernández-Sola J, Robert J, Antúnez E, Cofan M, Cardenal C, Sacanella E, Estruch R, Urbano-Marquez A. High ethanol intake and malnutrition in alcoholic cerebellar shrinkage. *QJM* 2000; 93(7): 449-456.

Nie Z, Madamba SG, Siggins GR. Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;271:1566.

Nunley K, Bhave B, Tabakoff B, Hoffman PL. Altered cellular localization of NMDA receptor subunits after chronic ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25:8.

Obernier JA, Bouldin TW, Crews FT. Binge ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26:547.

Okabe S, Miwa A, Okado H. Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 1999; 19(18): 7781-7792.

Olney JW, Labruyere J, Wang G, Wozniak DF, Price MT, Sesma MA. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 1991; 254: 1515-1518.

Orrego F, Villanueva S. The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience*. 1993; 56:539-55.

Ozawa S, Haruyuki Kamiya, Tsuzuki K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 581-618

Park PH, Lim RW, Shukla SD. Involvement of histone acetylation in ethanol-induced acetylation of histone H3 in hepatocytes: potential mechanism for gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 289: 1124-1136.

Pawlak R, Melchor JP, Matys T, Skrzypiec AE, Strickland S. Ethanol-withdrawal seizures are controlled by tissue plasminogen activator via modulation of NR2B-containing NMDA receptors. *PNAS* 2005; 102 (2): 443-448.

Petrakis IL, Limoncelli D, Gueorguieva R, Jatlow P, Boutros NN, Trevisan L, Gelernter J, Krystal JH. Altered NMDA glutamate receptor antagonist response in individuals with a family vulnerability to alcoholism. *Am J Psychiatry* 2004; 161(10): 1776-1782.

Piggott MA, Perry EK, Saghal A, Perry RH. Examination of parameters influencing [3H]MK-801 binding in postmortem human cortex. *J Neurochem* 1992; 58: 1001-1008.

Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Harrison NL. The regulation of neuronal gene expression by ethanol. *Pharmacol Ther* 2009; 124: 324-335.

Plaitakis A, Berl S, Yahr MD. Abnormal glutamate metabolism in an adult-onset degenerative neurological disorder. *Science* 1982; 216: 193-196.

Poelchen W, Nieber K, Illes P. Tolerance to inhibition by ethanol of N-methyl-D-aspartate-induced depolarization in rat locus coeruleus neurons *in vitro*. *Eur J Pharmacol*. 1997;332:267.

Poelchen W, Kittner H, Sieler D, Regenthal R, Preiss R, Illes P. In vitro tolerance to inhibition by ethanol of N-methyl-D-aspartate-induced depolarisation in locus coeruleus neurons of behaviourally ethanol-tolerant rats. *Neurochem Int* 2001; 39: 51-58.

Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Harris, R. A., and Mayfield, R. D. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *J. Neurosci* 2012; 32, 1884–1897.

Popp RL, Lickteig R, Browning MD, Lovinger DM. Ethanol sensitivity and subunit composition of NMDA receptors in cultured striatal neurons. *Neuropharmacology* 1998; 37: 45-56.

Popp RL, Lickteig RL, Lovinger DM. Factors that enhance ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 1564-1574.

Preuss UW, Zill P, Koller G, Bondy B, Hesselbrock V, Soyka M. Ionotropic glutamate receptor gene GRIK3 SER310ALA functional polymorphism is related to delirium tremens in alcoholics. *Pharmacogenomics J.* 2006 Jan-Feb;6(1):34-41.

Prybylowski K, Fu Z, Losi G, Hawkins LM, Luo J, Chang K, Wenthold RJ, Vicini S. Relationship between availability of NMDA receptor subunits and their expression at the synapse. *J Neurosci* 2002; 22: 8902-8910.

Pyapali GK, et al. Age- and dose-dependent effects of ethanol on the induction of hippocampal long-term potentiation. *Alcohol.* 1999;19:107.

Qiang M, Denny A, Chen J, Tikku MK, Yan B, Henderson G. The site specific demethylation in the 5'-regulatory area of NMDA receptor 2B subunit gene associated with CIE-induced up-regulation of transcription. *PLoS ONE* 2010 5:e8798.

Rabe CS, Tabakoff B. Glycine site-directed agonists reverse the actions of ethanol at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 1990; 38: 753-757.

Raeder H, Holter SM, Hartmann AM, Spanagel R, Moller HJ, Rujescu D. Expression of N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor subunits and splice variants in an animal model of long-term voluntary alcohol self-administration. *Drug Alcohol Depend* 2008 Jul 1; 96(1-2): 16-21.

Rammes G. The anti-craving compound acamprosate acts as a weak NMDA-receptor antagonist, but modulates NMDA-receptor subunit expression similar to memantine and MK-801. *Neuropharmacology*. 2001;40:749.

Randoll LA, Wilson WR, Weaver MS, Spuhler-Phillips K, Leslie SW. N-methyl-D-aspartate-stimulated increases in intracellular calcium exhibit brain regional differences in sensitivity to inhibition by ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 197-200.

Rao A, Craig AM. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron* 1997; 19: 801-812.

Ray LA, Miranda R Jr, MacKillop J, McGeary J, Tidey JW, Rohsenow DJ, Gwaltney C, Swift RW, Monti PMA preliminary pharmacogenetic investigation of adverse events from topiramate in heavy drinkers. *Exp Clin Psychopharmacol*. 2009 Apr; 17(2): 122-9.

Raymond LA, Blackstone CD, Huganir RL. Phosphorylation and modulation of recombinant GluR6 glutamate receptors by camp-dependent protein kinase. *Nature (Lond)* 1993; 361: 637-641.

Ren H. Mutations at F637 in the NMDAR NR2A subunit M3 domain influence agonist potency, ion channel gating and alcohol action. *Br J Pharmacol*. 2007;151:749

Ren H, Zhao Y, Doard D, Peopoles RW. Interaction among position in the third and fourth membrane-associated domains at the subunit interface of the NMDA receptor forming sites of alcohol action. *J Biol Chem* 2012; 287: 27302-27312.

Ridge J, Ho A, Innes D, Dodd P. The Expression of NMDA Receptor Subunit mRNA in Human Chronic Alcoholics. Influence of Cirrhosis and Genotype. *Ann N.Y Acad Sci* 2008; 1139: 10–19.

Ridge JP, Ho AM, Dodd PR. Sex differences in NMDA receptor expression in human alcoholics. *Alcohol Alcohol* 2009 Nov-Dec; 44(6): 594-601

Rimondini R, Arlinde C, Sommer W, Heilig M. Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. *FASEB J* 2002; 16: 27-35.

Roberto M, Schweitzer P, Madamba SG, Stouffer DG, Parsons LH, Siggins GR. Acute and chronic ethanol alter glutamatergic transmission in rat central amygdala: an in vitro and in vivo analysis. *J Neurosci* 2004; 24(7): 1594-1603.

Roberto M, et al. Chronic ethanol exposure and protracted abstinence alter NMDARs in central amygdala. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31:988.

Roberts M, Shapiro M. NMDA receptor antagonists impair memory for nonspatial, socially transmitted food preference. *Behav Neurosci* 2002; 116: 1059-1069.

Rodriguez-Moreno A, Sihra TS. Presynaptic kainate receptor facilitation of glutamate release involves protein kinase A in the rat hippocampus. *J Physiol* 2004; 557: 733-745.

Roesner S, Leucht S, Lehert P, Soyka M. Acamprosate supports abstinence, naltrexone prevents excessive drinking: evidence from a meta-analysis with unreported outcomes. *J Psychopharmacol* 2008; 22:11–23.

Ron D, Wang J. Biology of NMDA receptor. Van Dongen AM, ed. Boca Raton (FL), 2009.

Ronald KM, Mirshani T, Woodward J. Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors is reduced by site-directed mutagenesis of a transmembrane domain phenylalanine residue. *J Biol Chem* 2001; 276: 44729-44735.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL. Marked decrease of extraneuronal dopamine after alcohol withdrawal in rats: reversal by MK-801. *Eur J Pharmacol* 1991 ; 200 : 371-372.

Rossetti ZL, Carboni S, Fadda F. Glutamate-induced increase of extracellular glutamate through N-methyl-D-aspartate receptors in ethanol withdrawal. *Neuroscience* 1999; 93, 1135-1140.

Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19(2): 105-111.

Rowan MJ, Klyubin I, Cullen WK, Anwyl P. Synaptic plasticity in animal models of early Alzheimer's disease. *Biological Sciences* 2003; 358(1432): 821-8.

Rudolph JG, Walker DW, Iimuro Y, Thurman RG, Crews FT. NMDA receptor binding in adult rat brain after several chronic ethanol treatment protocols. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1508-1519.

Rujescu D, Soyka M, Dahmen N, Preuss U, Hartmann AM, Giegling I, Koller G, Bondy B, Möller HJ, Szegedi A. GRIN1 locus may modify the susceptibility to seizures during alcohol withdrawal. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005 Feb 5; 133B(1): 85-7.

Rycroft BK, Gibb AJ. Inhibitory interactions of calcineurin (phosphatase 2B) and calmodulin on rat hippocampal NMDA receptors. *Neuropharmacology*. 2004; 47:505-514.

Salter MW, Kalia LV Sr. c kinases: a hub for NMDAR regulation. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5:317

Sanna E, Serra M, Cossu A, Colombo G, Follesa P, Cuccheddu T, Concas A, Biggio G. Chronic ethanol intoxication induces differential effects on GABA A and NMDA receptor function in the rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 115-123.

Sattler R, Xiong Z, Lu WY, MacDonald JF, Tymianski M. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 2000; 20: 22-23.

Scatton B, Carter C, Benavides J, Giroux C. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: a novel therapeutic perspective for the treatment of ischemic brain injury. *Cerebrovasc Dis* 1991; 1: 121-125.

Schuckit MA. Genetics and the risk for alcoholism. *JAMA* 1985; 254: 2614-2617.

Schuckit MA. Reactions to alcohol in sons of alcoholics and controls. *Alcohol Clin Exp Res* 1988; 12: 465-470.

Schüler T, Mesic I, Madry C, Bartholomäus I, Laube B. Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly. *J Biol Chem*. 2008; 283:37-46.

Schummers J, Browning MD. Evidence for a role for GABA(A) and NMDARs in ethanol inhibition of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001;94:9.

Scott DB, Blanpied TA, Swanson GT, Zhang C, Ehlers MD. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci*. 2001; 21:3063-3072.

Seeburg PH. The TINS/TIPS lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 1993; 16: 359-365.

Self RL, Mulholland PJ, Harris BR, Nath A, Prendergast MA. Cytotoxic effects of exposure to the human immunodeficiency virus type 1 protein Tat in the hippocampus are enhanced by prior ethanol treatment. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(12): 1916-1924.

Sellers EM, Kalant H. Drug therapy : Alcohol intoxication and withdrawal. *N Engl J Med* 1976; 294: 757-762.

Sharp FR, Jasper P, Hall J, Noble L, Sagar SM. MK-801 and ketamina induce heat shock protein HSP72 in injured neurons in posterior cingulate and retrosplenial cortex. *Ann Neurol* 1992; 30: 801-809.

Shaw PJ. Excitatory amino acid receptors, excitotoxicity and the human nervous system. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 1993; 6: 414-422.

Shleper, M., Kartvelishvily, E., Wolosker, H. D-serine is the dominant endogenous coagonist for NMDA receptor neurotoxicity in organotypic hippocampal slices. *J Neurosci* 2005; 25: 9413-9417.

Simson PE, Criswell HE, Breese GR. Inhibition of NMDA-evoked electrophysiological activity by ethanol in selected brain regions: evidence for ethanol-sensitive and ethanol-insensitive NMDA-evoked responses. *Brain Res.* 1993;607:9.

Smothers CT, Woodward JJ. Effects of amino acid substitutions in transmembrane domains of the NR1 subunit on the ethanol inhibition of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006 Mar;30(3):523-30

Smothers CT, Woodward JJ. Deletion of the N-terminal domain alters the ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in a subunit-dependent manner. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013 Nov;37(11):1882-90.

Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Radioligand binding to the N-methyl-D-aspartate receptor/ionophore complex: alterations by ethanol in vitro and by chronic in vivo ethanol ingestion. *Brain Res* 1993; 602: 91-98.

Snell LD, Nunley KR, Lickteig RL, Browning MD, Tabakoff B, Hoffman PL. Regional and subunit specific changes in NMDA receptor mRNA and immunoreactivity in mouse brain following chronic ethanol ingestion. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 40: 71-78.

Snell LD, Claffey DJ, Ruth JA, Valenzuela CF, Cardoso R, Wang Z, Levinson SR, Sather WA, Williamson AV, Ingersoll NC, Ovchinnikova L, Bhave SV, Hoffman PL, Tabakoff B. Novel structure having antagonist actions at both the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor and neuronal voltage-sensitive sodium channels: biochemical, electrophysiological, and behavioural characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 215-227.

Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC. Epigenetics-Beyond the genome in alcoholism. *Alcohol Res* 2012; 34: 325-337.

Stephenson FA. Structure and trafficking of NMDA and GABA_A receptors. *Biochem Soc Trans* 2006; 34: 877-881.

Stromberg MF, Volpicelli JR, O'Brien CP, Mackler SA. The NMDA receptor partial agonist, 1-aminocyclopropanecarboxylic acid (ACPC), reduces ethanol consumption in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1999; 64: 585-590.

Szabo G, Tabakoff B, Hoffman PL. The NMDA receptor antagonist dizocilpine differentially affects environment-dependent and environment-independent ethanol tolerance. *Psychopharmacology (Berl)* 1994; 113: 511-517.

Tabakoff B, Hoffman PL. Ethanol and glutamate receptors. In "Pharmacological effects of ethanol on the nervous system", RA Deitrich and VG Erwin eds. CRC Press, Boca Raton. 1996: 73-93.

Tabakoff B, Bhave SV, Hoffman PL. Selective breeding, quantitative trait locus analysis and gene arrays identify candidate genes for complex drug-related behaviors. *J Neurosci* 2003; 23: 4491-4498.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M, Liu G, Tsien JZ. Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* 1999; 401: 63-69.

Tang YP, Wang H, Feng R, Kyin M, Tsien J. Differential effects of enrichment of learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Nature* 2001; 401: 63-69.

Thomas MP, Monaghan DT, Morrisett RA. Evidence for a causative role of N-methyl-D-aspartate receptors in an *in vitro* model of alcohol withdrawal hyperexcitability. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998;287:87

Thompson AD, Ryle PR, Shaw GK. Ethanol, thiamine and brain damage. *Alcohol Alcoholism* 1983; 18: 27-43.

Tingley WG, Roche KW, Thompson AK, Hanganir RL. Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 1993; 364: 70-73.

Tingley WG, Ehlers MD, Kameyama K, Doherty C, Ptak JB, Riley CT, Hanganir RL. Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-

methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 1997; 272: 5157-5166.

Tokuda K, Zorumski CF, Izumi Y. Modulation of hippocampal long-term potentiation by slow increases in ethanol concentration. *Neuroscience*. 2007;146:340.

Torvik A, Lindboe CF, Rodge S. Brain lesions in alcoholics: a neuropathological study with clinical correlations. *J Neurol Sci* 1982; 56: 233-248.

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF. Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*. 1995; 268:873-6.

Tremwel MF, Anderson KJ, Hunter BE. Stability of [3H]MK-801 binding sites following chronic ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 1004-1008.

Trevisan L, Fitzgerald LW, Brose N, Gasic GP, Heinemann SF, Duman RS, Nestler EJ. Chronic ingestion of ethanol up-regulates NMDAR1 receptor subunit immunoreactivity in rat hippocampus. *J Neurochem* 1994; 62: 1635-1638.

Tsai G, Coyle JT. The role of glutamatergic neurotransmission in the pathophysiology of alcoholism. *Annu Rev Med*.1998;49:173.

Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. Calcium channels coupled to glutamate release. *Science* 1992; 258: 310-313.

Turrigiano GG. AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity. *Neuron* 2000; 26: 5-8.

Urbano-Márquez A, Estruch R, Navarro-López F, Grau JM, Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med* 1989; 320: 409-415.

Urbano-Márquez A, Estruch R. Enfermedades neuromusculares producidas por el alcohol. *MTA Medicina Interna* 1987; 5: 581-612.

Vengeliene V, Bachteler D, anysz W, Spanagel R. The role of the NMDA receptor in alcohol relapse: a pharmacological mapping study using the alcohol deprivation effect. *Neuropharmacology* 2005; 48(6): 822-829.

Vetreno RP, Hall JM, Savage LM. Alcohol-related amnesia and dementia: animal models have revealed the contributions of different etiological factors on neuropathology, neurochemical dysfunction and cognitive impairment. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96(4): 596-608.

Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 1998; 79: 555-566.

Victor M, Adams RD, Mancall EL. A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. *Arch Neurol* 1959; 1: 579-588.

Victor M, Adams RD, Collins GH. The Wernicke-Korsakoff syndrome and related neurologic disorders due to alcoholism and malnutrition. *Contemporary neurology series*. Vol 3. FA. Davis, Philadelphia 1989.

Villalta J, Estruch R, Antúnez E, Valls J, Urbano-Márquez A. Vagal neuropathy in chronic alcoholics: Relation to ethanol consumption. *Alcohol Alcoholism* 1989; 24: 421-428.

Villarroel A, Burnashev N, Sakmann B. Dimension of the narrow portion of a recombinant NMDA receptor channel. *Biophys. J.* 1995; 68: 866-875.

Wang J, et al. Ethanol induces long-term facilitation of NR2B-NMDAR activity in the dorsal striatum: implications for alcohol drinking behavior. *J Neurosci.* 2007;27:3593.

Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M. Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* 1992; 3: 1138-1140.

Watkins JC, Krogsgaard-Larsen, Honoré T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11: 25-33.

Weiss F, Lorang MT, Bloom FE, Koob GF. Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 250-258.

Weiss SW, Albers DS, Iadarola MJ, Dawson TM, Dawson VL, Standaert DG. NMDAR1 glutamate receptor subunit isoforms in neostriatal, neocortical, and hippocampal nitric oxide synthase neurons. *J Neurosci* 1998; 18 (5): 1725-1734.

Welch KMA, Barkley GL, Tepley N, Ramadan NM. Central neurogenic mechanisms of migraine. *Neurology* 1993; 43 Supl 3: 21-25.

Wernicke C, Samochowiec J, Schmidt LG, Winterer G, Smolka M, Kucharska-Mazur J, Horodnicki J, Gallinat J, Rommelspacher H. Polymorphisms in the N-methyl-D-aspartate receptor 1 and 2B subunits are associated with alcoholism-related traits. *Biol Psychiatry* 2003; Nov 54(9):922-8.

White AM, Matthews DB, Best PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus*. 2000;10:88.

Whittington MA, Lambert JD, Little HJ. Increased NMDA receptor and calcium channel activity underlying ethanol withdrawal hyperexcitability. *Alcohol Alcohol* 1995; 30: 105-114.

Willets J, Balster RL, Leander JD. The behavioural pharmacology of NMDA receptor antagonists. *Trends Pharmacological Sci* 1990; 11: 423-428.

Winkler A, Mahal B, Kiianmaa K, Zieglansberger W, Spanagel R. Effects of chronic alcohol consumption on the expression of different NR1 splice variants in the brain of AA and ANA lines of rats. *Brain Res Mol Brain Res* 1999; 72: 166-175.

Wirkner K, Poelchen W, Koles L, Muhlberg K. Ethanol-induced inhibition of NMD-receptor channels. *Neurochem Int* 1999;35: 153-162.

Wolf ME. LTP may trigger addiction. *Molecular interventions* 2003; 3(5): 248-52.

Wollmuth LP, Kuner T, Seebrug PH, Sakmann B. Differential contribution of the NR1- and NR2A-subunits to the selectivity filter of recombinant NMDA receptor channel. *J. Physiol. (Lond.)* 1996; 491: 779-797.

Wright JM, Peoples RW, Weight FF. Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res* 1996; 738: 249-256.

Wu PH, Tabakoff B, Szabo G, Hoffman PL. Chronic ethanol exposure results in increased acute functional tolerance in selected lines of HAFT and LAFT mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 155: 405-412.

Yang X, Crsiwell HE, Simson P, Moy S, Breese GR. Evidence for a selective effect of ethanol on N-methyl-D-aspartate responses: ethanol affects a sbtype of the ifenprodil-sensitive N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp* 1996; 278: 114-124.

Yu M, Smothers CT, Trudell J, Woodward JJ. Ethanol inhibition of constitutively open N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012 Jan;340(1):218-26.

Zhang S, Edelman L, Liu J, Crandall JE, Morabito MA. Cdk5 Regulates the Phosphorylation of Tyrosine 1472 NR2B and the Surface Expression of NMDA Receptors. *J Neurosci* 2008 28(2):415-24.

Zukin RS, Bennett MV. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 1995; 18(7): 306-313.