

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Efecto del consumo intensivo y repetido de etanol sobre la integridad de la barrera hematoencefálica. Implicación de los receptores toll-like 4 (TLR4)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Francesca Porcu

DIRECTORAS

María Isabel Colado Mejía

Esther O'Shea Gaya

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
FARMACOLOGÍA



Efecto del consumo intensivo y repetido de
etanol sobre la integridad de la barrera
hematoencefálica. Implicación de los
receptores *toll-like* 4 (TLR4)

TESIS DOCTORAL

Francesca Porcu
Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

Directoras:

Dra. M^a Isabel Colado Megía
Dra. Esther O'Shea Gaya

Francesca Porcu
Madrid, 2014

ABREVIATURAS

α2-AP, α2-antiplasmina

2,3-DHBA, ácido 2,3-dihidroxibenzoico

5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético

5-HT, 5-hidroxitriptamina; serotonina

ABC, ATP binding cassette

ADH, alcohol deshidrogenasa

ADN, ácido desoxiribonucleico

ADP, adenosín difosfato

al, colaboradores

ALDH, aldehído deshidrogenasa

AMPA, α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato

AMPT, α-metil-p-tirosina

ANOVA, análisis de varianza

ANG-1, angiotensina-1

AP-1, proteína activadora-1

AR, artritis reumatoide

ARN, ácido ribonucleico

ATF, factor activador de la transcripción

ATP, adenosín trifosfato

APMA, acetato de aminofenil mercurio

BEC, concentración de etanol en sangre

BHE, barrera hematoencefálica

BMVEC, células endoteliales microvasculares del cerebro

BSA, seroalbúmina bovina

CD, *cluster* de diferenciación

CSF, fluido cerebroespinal

CuZnSOD, superóxido dismutasa cobre-zinc

DA, dopamina

DAT, transportador de dopamina

DEH, dosis equivalente en humano

DID, drinking in the dark

DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético

E.E.M, error estándar de la media

ELA, esclerosis lateral amiotrófica

ELT, epilepsia del lóbulo temporal

ERK, kinasa regulada extracelularmente

p-ERK, kinasa regulada

extracelularmente fosforilada

EtOH, etanol

bFGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico

g, gramos

GABA, ácido γ-aminobutírico

GD, giro dentado

GDNF, factor neurotrófico de derivación glial

h, horas

h.p.l.c. cromatografía líquida alta resolución

HRP, peroxidasa de rábano

HSP, proteínas de choque térmico

HMGB1, proteína del grupo de alta movilidad Box1

HVA, ácido homovanílico

i.p., intraperitoneal
IFN, interferón
IgG, inmunoglobulina G
IL, interleuquina
ISF, fluido intersticial cerebral
ISZ, zimografía *in situ*
JNK, c-jun terminal kinasa
t-JNK, c-jun terminal kinasa total
p-JNK, c-jun terminal kinasa fosforilada
kDa, kilo Dalton
kcal, kilocaloría
KO, *knockout*
L, litros
L-DOPA, L-3,4 dihidroxifenilalanina
LCR, líquido cefalorraquídeo
log, logaritmo
LPA, lesión pulmonar aguda
LPS, lipopolisacárido
LTC₄, leucotrienos C₄
M, molaridad
MAO, monoamino oxidasa
MAPK, proteínas kinasas activadas por mitógenos
MD, proteína mieloide de diferenciación.
MDMA, 3,4-metilenodioximetanfetamina
ME, matriz extracelular
MEOS, sistema de oxidación microsomal
METH, metanfetamina
mg, miligramos
mg/kg, miligramos por kilogramo
min, minutos
ml, mililitros
mm, milímetros
mM, milimolar
MMP, metaloproteinasa de matriz
n, número de animales por grupo
NA, noradrenalina
NAc, núcleo accumbens
NaF, Fluoruro Sódico
NFκB, factor nuclear kappa B
NIAAA, National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism
NMDA, N-metil-D-aspartato
ng, nanogramos
NO, óxido nítrico
NOS, óxido nítrico sintasa
nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal
n.s., no significativo
OMS, Organización Mundial de la Salud
ONOO-, peroxinitrito
p, probabilidad
PA, activadores de plasminógeno
t-PA, plasminógeno tisular
uPA, urocinasa
PAI, inhibidor del activador de plasminógeno
PB, tampón fosfato
PBN, α-fenil-N-terbutil nitrona
PET, Tomografía de emisión de positrones
PRR, receptores Pattern Recognition
p/v, peso/ volumen
ROS, especies reactivas de oxígeno
s, segundo
s.c., subcutáneo

SDS, dodecilsulfato sódico

SERT, transportador de serotonina

SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SLC, *solute carrier*

SN, sustancia negra

SNC, sistema nervioso central

SNP, sistema nervioso periférico

SOD, superóxido dismutasa

TAIF, inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina

TDAAH, trastorno por déficit de atención con hiperactividad

TH, tirosina hidroxilasa

TIMP, inhibidor tisular de metaloproteínasa

TJ, uniones estrechas

TLR, receptores Toll-like

TMD, dominio transmembrana

TNF α , factor de necrosis tumoral alfa

TPH, triptófano hidroxilasa

u.a., unidades arbitrarias

UCM, Universidad Complutense de Madrid

UCP-3, proteína de desacoplamiento 3

VIH, virus de inmunodeficiencia humana

VMAT2, Transportador vesicular de monoaminas.

V_{max}, velocidad máxima

vs., versus

v/v, volumen/volumen

WT, *wild-type*

ZO, zonula ocludens

μ A, microamperio

μ g, microgramo

μ l, microlitros

μ M, micromolar

μ m, micrometro

%, porcentaje

[3 H], tritio

$^{\circ}$ C, grado centígrado

Ω , ohmio

ÍNDICE

	Pág.
- RESUMEN	1
- SUMMARY	9
- INTRODUCCIÓN	16
Sección 1: BARRERA HEMATOENCEFALICA	16
1. Aspectos generales	16
2. Transporte celular en la BHE	18
3. Regulación de los neurotransmisores y macromoléculas	21
4. Regulación de la homeostasis iónica	23
5. Estructura de la BHE	24
5.1. Unidad neurovascular	24
5.2. Células endoteliales	24
5.3. Pericitos	27
5.4. Astrocitos	28
5.5. Microglia	29
5.6. Lamina basal o matriz extracelular	30
6. Metaloproteinasas	32
6.1. Clasificación	33
7. Plasminógeno, plasmina y sus activadores	34
8. BHE y patologías del SNC	36
Sección 2: ETANOL	38
1. Aspectos generales y marco histórico	38
2. Estructura química del etanol	41
3. Farmacocinética del etanol	42
3.1. Absorción	42
3.2. Distribución	43
3.3. Metabolismo	43
3.3.1. Metabolismo periférico del etanol	43
3.3.2. Metabolismo central del etanol	44

4. Efecto del etanol en el SNC	45
4.1. Efecto en diferentes sistemas de neurotransmisión	46
4.2. Etanol, funciones cognitivas y memoria	47
5. Etanol y adolescencia	51
6. Modelo de <i>binge drinking: drinking in the dark</i>	52
7. Etanol y neuroinflamación	57
7.1. Etanol y receptores <i>toll-like</i> (TLR4)	60
8. Proteína del grupo de Alta Movilidad Box1 (high mobility group box 1, HMGB1)	65
9. Etanol Y BHE	67
- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	69
1. Hipótesis	70
2. Objetivos generales	70
3. Objetivos específicos	70
- MATERIAL Y METODOS	71
1. Animales	71
2. Modelo experimental: consumo de etanol en la oscuridad (<i>Drinking in the Dark, DID</i>)	72
3. Diseño experimental	76
3.1. Efecto del etanol sobre parámetros indicativos de alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE)	76
3.2. Efecto del etanol sobre parámetros indicativos de neuroinflamación	76
3.2.1. Efectos del etanol sobre la activación glial	76
3.2.2. Efectos del etanol sobre la expresión del receptor de tipo Toll 4 y mediadores de señalización intracelular de este receptor (MyD88, ERK, c-fos)	77
3.2.3. Efectos del etanol sobre la expresión de HMGB1	77
3.3. Efectos del etanol sobre la muerte neuronal	78
4. Descripción de las técnicas experimentales	78
4.1. Cuantificación de los niveles de etanol en plasma	78
4.2. Determinación de expresión proteica	78
4.2.1. Extracción y homogenización de la muestra	78
4.2.2. Western blot	79
4.3. Actividad de metaloproteinasas	82
4.3.1. Zimografía en gel de gelatina	82

4.3.2. Zimografía en gel de caseína	83
4.4. Actividad de t-pa	83
4.4.1. Zimografía en gel de t-pa	83
5. Inmunohistoquímica	83
5.1. Preparación del tejido	83
5.2. Técnica inmunohistoquímica	84
5.3. Estudio de extravasación de Inmunoglobulina G	85
6. Estudio de muerte neuronal: Fluoro-Jade	86
7. Análisis estadístico	86
- RESULTADOS	87
1. Consumo de etanol	87
2. Concentración plasmática de etanol	89
3. Consumo de comida durante la exposición a etanol	89
4. Variación en el peso corporal durante la exposición a etanol	91
5. Temperatura rectal durante la exposición a etanol	91
6. Efecto de etanol sobre la extravasación de Inmunoglobulina G	92
7. Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de laminina y colágeno IV	95
7.1. Inmunorreactividad de laminina	95
7.2. Inmunorreactividad de colágeno IV	97
8. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática de MMP-9 y MMP-2	99
9. Cambios inducidos por etanol en la respuesta glial	102
9.1. Efectos del etanol en la respuesta astrogial	102
9.1.1. Inmunorreactividad de GFAP	102
9.1.2. Inmunorreactividad de S100B	104
9.2. Efecto del etanol en la respuesta microglial mediante el marcados Iba-1	106
10. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática de MMP-3	107
11. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática y la expresión del activador tisular del plasminógeno (t-PA)	109
12. Efecto del etanol sobre la muerte neuronal	112
13. Estudio de la señalización TLR4	113
13.1. Efecto del etanol sobre la expresión de TLR4	113
13.2. Efecto del etanol sobre la expresión de HMGB1	115
13.3. Efecto del etanol sobre la expresión de MyD88	116

13.4.Efecto del etanol sobre la expresión de las MAPK	118
13.5.Efecto del etanol sobre la expresión de la subunidad c-fos de la proteína AP-1	121
14. Efecto del etanol en animales <i>Knockout</i> TLR4	122
14.1.Consumo de etanol en animales TLR4- <i>KO</i>	122
14.2.Efecto de etanol sobre la expresión de glía en animales TLR4- <i>KO</i>	124
14.2.1. Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de GFAP e Iba-1	124
14.2.2. Efecto de etanol sobre la expresión de S100B	126
14.3.Efecto de etanol sobre la extravasación de IgG y la expresión de laminina y colágeno IV en hipocampo de animales TLR4- <i>KO</i>	128
14.3.1. Efecto de etanol sobre la extravasación de inmunoglobulina G en hipocampo de ratón en animales TLR4- <i>KO</i>	128
14.3.2. Expresión de laminina en animales TLR4- <i>KO</i>	129
14.3.3. Expresión de colágeno IV en animales TLR4- <i>KO</i>	131
14.4.Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en el hipocampo de ratón en animales TLR4- <i>KO</i>	133
14.4.1. Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en el giro dentado de ratón en TLR4- <i>KO</i>	133
14.4.2. Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en el CA3 de ratón en animales TLR4- <i>KO</i>	134
- DISCUSIÓN	137
- CONCLUSIONES	152
- BIBLIOGRAFIA	153

RESUMEN

Resumen

Introducción

La presente Tesis Doctoral consiste en el estudio de los efectos producidos por el consumo intensivo y repetido de etanol sobre la barrera hematoencefálica (BHE) en ratones adultos jóvenes y la implicación del receptor *Toll-like 4* (TLR4).

La BHE puede definirse como una propiedad funcional de los vasos sanguíneos que limita de manera selectiva el intercambio de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial cerebral regulando de esta manera la concentración de los compuestos endógenos y exógenos asegurando la homeostasis cerebral e impidiendo el ingreso de sustancias tóxicas en el cerebro. La unidad funcional de la BHE es la unidad neurovascular, formada por matriz extracelular, células endoteliales, pericitos, astrocitos, microglia y neuronas. Las células endoteliales de la BHE están unidas a través de uniones estrechas que eliminan de manera eficaz el transporte paracelular y constituyen la pared de los capilares cerebrales. Todos los tipos de transporte existentes son casi exclusivamente transcelulares y pueden realizarse por varias rutas, difusión pasiva, a través de los transportadores ABC o SCL. Las células endoteliales interactúan con los pericitos que son los que le proporcionan estabilidad mecánica y están rodeados por la lamina basal, una matriz extracelular que proporciona soporte físico a las células endoteliales y a los pericitos y que está compuesta por laminina, fibronectina, colágeno tipo IV y proteoglicanos. Las células endoteliales interactúan también con los pies astrocitarios que abrazan los capilares y son fundamentales en la estructura de la unidad neurovascular. La lamina basal ayuda la formación de las uniones estrechas y su alteración está asociada con el aumento de permeabilidad de la BHE. Entre los factores que degradan la BHE están las enzimas metaloproteinasas y en particular, se ha observado como en una gran variedad de patologías hay un aumento de las gelatinasas MMP-9, MMP-2 y de la stromielosina MMP-3, aumentos que conducen a una mayor permeabilidad de la BHE. Por otro lado hay otras enzimas proteolíticas que degradan la barrera entre las cuales se encuentra la

plasmina, una o serin proteasa que degrada los componentes de la matriz extracelular directamente o a través de la activación de algunas MMPs. La plasmina deriva del plasminógeno que se convierte en plasmina mediante la intervención de sus activadores como el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA).

El etanol es el principal componente de las bebidas alcohólicas. Es la droga más antigua y su fácil reperibilidad y su bajo precio hacen que sea la droga más consumida en España, Europa y Estados Unidos. La Organización Mundial de la Salud ha evidenciado una disminución de la edad de primer consumo de esta droga hasta los 12-13 años e informa que el consumo en adolescentes de 18 años es equiparable o incluso supera el consumo en adultos. En la adolescencia el consumo de etanol es intensivo y mayormente concentrado en algunos días de la semana. Este tipo de consumo elevado concentrado en un reducido periodo de tiempo da lugar a un patrón de consumo intensivo denominado en inglés "*binge drinking*". El procedimiento *Drinking in the Dark* (DID) está aceptado como modelo animal de *binge drinking* ya que induce a los animales a beber la cantidad necesaria de etanol para lograr concentraciones plasmáticas de, al menos, 100 mg/dl. Este protocolo se realiza en ciclo invertido de luz (12 horas) manteniendo a los animales en jaulas individuales. Tres horas después del comienzo del ciclo de oscuridad el agua se sustituye por etanol realizándose este procedimiento durante 4 días consecutivos, los primeros tres días la exposición se mantiene durante 2 horas y el cuarto día se amplía a 4 horas. Estos 4 días son los que constituyen un ciclo de consumo. El etanol afecta las funciones cognitivas induciendo daños dosis-dependientes y el hipocampo juega un papel importante en estas funciones siendo fundamental en la formación de los recuerdos temporales y de contexto (memoria episódica). El consumo crónico de etanol induce neuroinflamación y neurodegeneración, procesos en los que intervienen productos oxidativos y nitrooxidativos que se generan en su metabolismo y que causan daño neuronales y en la BHE aumentando la migración de agentes tóxicos y de células inmunes desde el torrente sanguíneo. El abuso de alcohol contribuye a la aparición de enfermedades neurodegenerativas y altera la BHE aumentando su permeabilidad, a través de la de acción sobre las uniones estrechas y sobre las enzimas fundamentales para su remodelación como las

MMPs. Recientes estudios en cultivos han demostrado también la capacidad del etanol de inducir cambios en el sistema t-PA-plasmina.

Los procesos a través de los cuales el etanol induce daño cerebral no están claros, pero se ha demostrado que el TLR4 juega un papel importante. Los receptores toll-like reconocen patrones moleculares (entre ellos, la proteína de alta movilidad Box1, HMGB1) y son capaces de reconocer estructuras típicas de patógenos; por esto están implicados en la inmunidad innata. Hasta ahora se han descrito trece diferentes tipos de receptores en humanos y en ratones. Los TLR se expresan en las células gliales y recientes estudios han demostrado la expresión de algunos de ellos en neuronas. La vía de señalización intracelular de los TLR es compleja y puede ser dependiente o independiente de la proteína adaptadora mioide 88 (factor de diferenciación mioide 88, MyD88). Tanto la vía MyD88 dependiente como la vía MyD88 independiente inducen la secreción de proteínas proinflamatorias (citoquinas, enzimas metabólicas) a través de factores de transcripción comunes como AP-1 y NF- κ B. La vía MyD88 dependiente induce la fosforilación de las MAPK (ERK, JNK y p38) y promueve la translocación al núcleo de AP-1. AP-1 es un factor de transcripción implicado en funciones celulares fundamentales como la supervivencia celular y la apoptosis mediante fosforilación de sus subunidades que suelen ser formadas por el heterodímero c-Jun/c-Fos. La activación de los TLR en el SNC participa en los procesos neuropatológicos y neurodegenerativos. La administración crónica de etanol activa los TLR y sus vías de señalización induciendo neuroinflamación y degeneración neuronal.

Hipótesis

En base a estos antecedentes parece razonable pensar que el consumo intensivo de alcohol utilizando el paradigma DID en ratones produzca modificaciones en la lamina basal de la barrera hematoencefálica mediante el aumento de actividad de enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas y la plasmina y que estos cambios impliquen la activación del TLR4 y su vía de señalización.

Material y métodos

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron ratones macho C57BL/6J de un peso inicial de 20-25 gramos, ratones *silvestres* (*Wild-type*, *WT*) de la cepa C57BL/6 y ratones TLR4 *Knockout* (TLR4-KO) mutantes con un fondo genético C57BL/6. Todos se sometieron al paradigma DID, aceptado como modelo animal de *binge drinking*. El ciclo de consumo se repitió durante 4 semanas y entre cada ciclo se dejaron 3 días de descanso. Tanto después de un ciclo de exposición a etano, como después de 4 ciclos los animales se sacrificaron inmediatamente después haber retirado el etanol o a las 24 horas. Los estudios se efectuaron en el hipocampo siendo este área muy susceptible al daño causado por etanol y muy importante en procesos como memoria y aprendizaje, funciones que son afectadas por el consumo de etanol según la dosis. Todas las determinaciones en esta Tesis Doctoral se realizaron en hipocampo y, siempre que fue posible, se analizaron por separado tres de las distintas zonas que lo componen, giro dentado, CA1 y CA3. Las técnicas que se utilizaron para medir la expresión de proteínas fueron inmunohistoquímica y Western blot, para determinar activación glial se utilizó inmunohistoquímica, para cuantificar la actividad de MMPs y t-PA se utilizó zimografía en gel y finalmente para evaluar la muerte neuronal se utilizó inmunotinción con Fluro-Jade.

Resultados

El consumo de etanol en animales sometidos a un ciclo de DID fue constante durante los 3 primeros días aumentando en el 4º día de acuerdo con las horas de exposición. Este patrón se repitió en los 3 ciclos sucesivos. Así en el primer ciclo los animales consumieron 2.74 ± 0.18 g/kg los días de dos horas de exposición y 6.42 ± 0.92 g/kg el 4º día de exposición. En los ciclos sucesivos la media en los 3 ciclos de consumo fue de 2.42 ± 0.08 g/kg los días de dos horas de exposición y 5.99 ± 0.20 g/kg el 4º día de exposición. La concentración plasmática de etanol alcanzada fue 135.2 ± 16.0 mg/dl y no observamos ningún cambio en la temperatura rectal de los animales. Los animales no modificaron la ingesta de comida durante los 4 ciclos de tratamiento ni se observaron

diferencias significativas en la ganancia de peso entre los animales expuestos a etanol y los animales controles.

Se estudió en primer lugar la permeabilidad de la BHE en las distintas zonas del hipocampo mediante la determinación inmunohistoquímica de la extravasación de inmunoglobulina G (IgG) al parénquima cerebral. Un aumento de la inmunorreactividad de esta proteína, que habitualmente no se encuentra en el parénquima cerebral, indica un aumento en la permeabilidad de la BHE. Los animales se expusieron a 1 ciclo o a 4 ciclos de DID y se sacrificaron inmediatamente después de retirar el etanol el último día del ciclo o 24h más tarde. El etanol aumentó la extravasación de IgG después de un ciclo en las tres zonas del hipocampo inmediatamente después de finalizar el consumo (160.6% en giro dentado, 66% en CA1 y 151.5% en CA3) y a las 24h (137.9% en giro dentado, 179.4% en CA1 y 124.2% en CA3) y de igual manera después de 4 ciclos inmediatamente después de finalizar el consumo (201.6% en giro dentado, 66.1% en CA1 y 166.3% en CA3) y a las 24h (326.1% en giro dentado, 179.4% en CA1 y 128.8% en CA3) reflejando un aumento de permeabilidad de la BHE. En base a estos resultados se procedió a analizar la expresión de las principales proteínas que componen la lámina basal, la laminina y el colágeno IV. Se observaron cambios en la expresión de laminina después de 4 ciclos en CA1 (28.7% inmediatamente después de finalizar el consumo y 38.6% a las 24h) y CA3 (27.8% inmediatamente después de finalizar el consumo y 39.4% a las 24h) y de colágeno IV después de un ciclo inmediatamente después de haber retirado el etanol (66.6% en CA1 y 42.3% en CA3) y a las 24h (56.4% en giro dentado, 65.2% en CA1 y 76.1% en CA3) y después de 4 ciclos inmediatamente después de finalizar el consumo (41.4% en giro dentado, 46.9% en CA1 y 47.1% en CA3) y a las 24h (56.6% en giro dentado, 68.8% en CA1 y 61.7% en CA3).

Teniendo en cuenta los cambios observados en las proteínas de la lámina basal se evaluó la actividad de las enzimas proteolíticas que podrían ser responsables de la degradación de estas proteínas. Se observó tanto después de un ciclo como después de 4 ciclos una disminución de la actividad de MMP-9 (para 1 ciclo: 34.5% inmediatamente después de finalizar el consumo y 20.9% a las 24h; y para 4 ciclos: 20.7% inmediatamente después de finalizar el consumo y 28.1% a las 24h) sin observar ningún cambio en la expresión de

MMP-2. A continuación se determinó la actividad enzimática de MMP-3 observándose un aumento en la actividad después de 4 ciclos de consumo, inmediatamente después de retirar el etanol (38.9%) y a las 24h (31.3%). De igual manera aumentó la expresión (51.2% al tiempo 0h y 41.8% a las 24h) y la actividad enzimática (93.7% al tiempo 0h y 52.2% a las 24h) de t-PA. En conjunto, estos resultados indican que MMP-9 y MMP-2 no parecen estar implicados en la disminución de la expresión de laminina y colágeno IV y que los cambios en la expresión de las proteínas que forman la lamina basal se correlacionan en el tiempo con el aumento de la actividad enzimática de MMP-3 y el aumento de expresión y actividad enzimática de t-PA.

Además, se analizó la respuesta glial en los animales sometidos a etanol durante 1 ciclo y durante 4 ciclos. Se observó un aumento de la activación glial a las 24h después de finalizar la exposición a 4 ciclos de etanol que se refleja por un aumento en la inmunoreactividad de GFAP (14.7% en giro dentado, 15.7% en CA1 y 16.9% en CA3) y de S100B (11.1% en giro dentado, 12.2% en CA1 y 10.5% en CA3). En cambio no se observan modificaciones en la inmunotinción de Iba-1, marcador de actividad microglial.

Utilizando la tinción con Fluoro-Jade, un fluorocromo que proporciona un marcaje específico de muerte neuronal, observamos un aumento en la inmunoreactividad en el giro dentado después de 4 ciclos de DID inmediatamente después de haber retirado el etanol (113.8%) y 24h más tarde (164.4%).

Estudios recientes indican la implicación de los receptores *Toll-like*, en concreto *TLR4*, en procesos de neuroinflamación y neurodegeneración. En el hipocampo de ratones sometidos al paradigma DID, se observó un aumento en la expresión de este receptor inmediatamente después de finalizar el consumo (23%) y a las 24h (22.9%) y un aumento en la expresión de algunas proteínas implicadas en su activación, la HMGB1, proteína ligando del TLR4 y de MyD88, proteína adaptadora específica de TLRs. La expresión de HMGB1 está aumentada después de 4 ciclos inmediatamente después de haber retirado el etanol (23.4%) y a las 24h (24.2%). Resultados similares se obtuvieron respecto a la expresión de MyD88, un aumento inmediatamente después de finalizar el consumo (26.5%) y a las 24h (24.4%). Vistos los efectos sobre la expresión de TLR4, HMGB1 y MyD88 y sobre la muerte neuronal, se analizó la

expresión de las MAPK. Los resultados nos indican que la exposición a etanol en este modelo no altera la expresión de la forma fosforilada de JNK pero sí modifica la expresión de las formas fosforiladas de p-38 (p-p38) y de ERK1/2 (p-ERK). La expresión de p-p38 aumenta 24h después de 4 ciclos (17.2%) mientras que la expresión de p-ERK aumenta inmediatamente después de retirar el etanol (32.7%) y a las 24h (30.1%). Teniendo en cuenta que el aumento en p-ERK es mayor y ocurre a ambos tiempos se analizó la subunidad c-fos de la proteína AP-1 activada directamente por esta MAPK. Se observó un aumento en la expresión de este factor de transcripción inmediatamente después de finalizar el consumo (40.7%) y a las 24h (26.9%).

Para estudiar la implicación del receptor TLR en los cambios producidos por etanol sobre la permeabilidad de la BHE, la actividad astrogliar y la muerte neuronal, se repitieron algunos protocolos experimentales en ratones TLR4 *Knockout* (TLR4-KO). Los animales TLR4-KO consumieron cantidades de etanol similares a aquellas consumidas por los ratones *WT* durante los 4 ciclos de DID a los que fueron expuestos aumentando el consumo el 4º día de cada ciclo debido al aumento de las horas de exposición. Ambos grupos de ratones se sacrificaron 24h después de haber retirado el etanol. En los animales *WT* se observó un aumento en la expresión de S100B (27.1% en giro dentado, 17.1% en CA1 y 24.5% en CA3), efecto que no fue observado en los animales TLR4-KO. De forma similar, los animales TLR4-KO no mostraron disminución en la expresión de laminina ni de colágeno IV ni incremento en la extravasación de IgG, cambios que sí se observaron en ratones *WT* (laminina: 29.3% en CA1 y 41.7 en CA3; colágeno IV: 42.7% en giro dentado, 54.4 en CA1 y 55.2 en CA3; IgG: 346.4% en giro dentado, 146.6 en CA1 y 312.6 en CA3). Además, la exposición a etanol produjo muerte neuronal en giro dentado (84%) y en CA3 (71.5%) en los animales *WT*, respuesta que no se observó en los animales TLR4-KO.

Conclusiones

El consumo intensivo y repetido de etanol mediante el procedimiento DID produce un aumento en la permeabilidad de la BHE que se asocia de manera temporal con una disminución de la expresión de laminina y sobre todo de colágeno IV, efectos que resultan más evidentes en CA1 y CA3 y que no están

relacionados con un aumento en la actividad de MMP-9 y MMP-2. En cambio, las alteraciones en la BHE parecen estar asociadas a una mayor actividad enzimática de MMP-3 de t-PA. El consumo intensivo y repetido de etanol induce activación astrogliar y muerte neuronal y un aumento en la señalización de TLR4.

Los cambios inducidos por etanol sobre la permeabilidad de la BHE, respuesta glial y muerte neuronal, implican la señalización de TLR4 ya que no se observan en ausencia de este receptor.

SUMMARY

Summary

Introduction

The current Ph.D. thesis studies to effects of intensive and repeated ethanol consumption on the blood-brain barrier (BBB) in young adult mice and the involvement of the Toll-like receptor 4 (TLR4) in these effects.

The BBB can be defined as a functional property of brain blood vessels which selectively limits the exchange of ions and organic molecules between blood plasma and cerebral interstitial fluid so regulating the concentration of endogenous and exogenous and thus ensuring brain homeostasis and preventing the entry of toxic substances into the brain. Transport in the brain is exclusively transcellular and can involve various different routes such as passive diffusion or by means of the ABC or SCL transporters. The functional unit of the BBB is the neurovascular unit which is composed of the extracellular matrix, endothelial cells, pericytes, astrocytes, microglia and neurons. The endothelial cells of the BHE, which constitute the walls of brain capillaries, are joined together by tight junctions that eliminate paracellular transport in an effective manner. These cells interact with the pericytes which are the cells which provide mechanical stability and both are surrounded by the basal lamina, an extracellular matrix which provides physical support, which is composed of laminin, fibronectin, collagen type IV and proteoglycans. The endothelial cells also interact with the astrocytic feet that surround the capillaries and are fundamental in the structure of the neurovascular unit. The basal lamina improves the tight junctions and alterations in it are associated with an increase in the permeability of the BBB. Among the factors that degrade the BBB are the metalloproteinase enzymes and specifically in a large number of pathologies the gelatinases MMP-9, MMP-2 and the stromelysin MMP-3 are increased leading to greater permeability of the BBB. Additionally, there are other proteolytic enzymes which degrade the barrier such as plasmin, a serine protease which degrades components of the extracellular matrix either directly or through the activation of some MMPs. Plasmin is formed from plasminogen

due to the action of various types of activators such as tissue plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA).

Ethanol is the principal component of alcoholic drinks. It is the oldest drug of abuse and the ease with which it can be produced and its low cost contribute to it being the most consumed drug in Spain, Europe and the United States. The World Health Organization has detected a fall in the age of first consumption of the drug to between 12 and 13 years of age and has reported that 18-year old adolescents consume as much as or even more than adults. During adolescence consumption of alcohol is usually intense and mostly concentrated in a few days. This type of elevated intake concentrated in a reduced period of time leads to a pattern of intensive consumption termed *binge drinking*. The procedure of Drinking in the Dark (DID) is accepted as a model of binge drinking since it induces animals to drink the amounts of ethanol necessary to reach plasmatic concentrations of at least 100mg/dl. The protocol is carried out with singly-housed animals in reversed cycle lighting (12h). Three hours after the start of the dark cycle their drinking water is replaced by ethanol on each of 4 consecutive days; the first three days the exposure time is 2h and on the 4th day the exposure time is extended to 4h. The 4 days constitute a cycle of consumption. Ethanol affects cognitive functions producing dose-dependent damage and the hippocampus plays an important role in these functions and is fundamental in the formation of temporal and contextual memories (episodic memory). Chronic consumption of ethanol induces neuroinflammation and neurodegeneration, processes involving oxidative and nitrosative products derived from its metabolism which damage neurones and the BBB, leading to an increase in the migration of toxic agents and immune cells from the blood across the BBB. The abuse of alcohol contributes to the development of neurodegenerative diseases and alters the BBB increasing its permeability through its action on tight junctions and on the enzymes that are fundamental in its remodeling like MMPs. Recent studies in cell culture have demonstrated the capacity of ethanol to produce changes in the t-PA-plasmin system.

The mechanisms involved in ethanol-induced damage are not completely clear but it has been shown that the TLR4 plays an important role. Toll-like receptors recognize molecular patterns (among them the High Mobility Group

Box 1 protein, HMGB1) and are capable of recognizing typical structures of pathogens and are thus involved in innate immunity. To date 13 different types of receptors have been described in humans and in mice. TLR are expressed in glial cells and recent studies have located some of these receptors in neurons. The intracellular signalling of these receptors is complex and can be either dependent or independent of the myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88). Both pathways lead to the secretion of proinflammatory proteins (cytokines, metabolic enzymes) through common transcription factors such as AP-1 and NF- κ B. The MyD88-dependent pathway induces the phosphorylation of MAPK (ERK, JNK and p38) and provokes the translocation of AP-1 to the nucleus. AP-1 is a transcription factor implicated in fundamental cell functions such as cell survival and apoptosis, through the phosphorylation of its subunits which are normally composed of the heterodimer c-Jun/c-Fos. The activation of TLR in the CNS participates in neuropathological and neurodegenerative processes. Chronic administration of ethanol activates TLRs and their signalling pathways inducing neuroinflammation and neurodegeneration.

Hypothesis

Based on the abovementioned evidence it is reasonable to suggest that the intensive consumption of ethanol using the DID paradigm in mice might induce modifications in the basal lamina of the BBB through an increase in the activity of proteolytic enzymes such as metalloproteinases and plasmin and that these changes might involve the activation of TLR4 and its signalling pathway.

Materials and methods

In this PhD thesis we used male C57BL/6J mice initially weighing 20-25 g, wild-type mice (*WT*) of the C57BL/6 strain and TLR4 Knockout mice (TLR4-KO) with a C57BL/6J genetic background. All animals were subjected to the DID paradigm, which is accepted as an animal model of binge drinking. The cycle of consumption was repeated for 4 weeks with a 3-day rest between cycles. For

both 1 cycle of exposure to ethanol and 4 cycles of exposure the mice were killed either immediately after removing the alcohol on the 4th day or 24h later. The studies were carried out in the hippocampus since this area is highly susceptible to ethanol-induced damage and is very important in memory and learning processes which are altered by ethanol consumption. All the parameters studied in this PhD thesis were determined in the hippocampus and whenever possible the dentate gyrus, CA1 and CA3 were studied separately. Protein expression studies were carried out using immunohistochemistry and Western blot, for the determination of glial cell activation the technique used was immunohistochemistry, MMP and t-PA activity were determined by gel zymography. Finally, neuronal death was determined using the Fluoro-Jade staining technique.

Results

Ethanol consumption in mice subjected to 1 cycle of DID was constant for the first three days and increased on the 4th day in accordance with the number of hours of exposure to the drug. The pattern repeated itself in the 3 successive cycles. Thus in the first cycle animals consumed 2.74 ± 0.18 g/kg of ethanol on the days on which they were subjected to 2h of ethanol exposure and 6.42 ± 0.92 g/kg on the 4th day of the cycle. In the following cycles the mice consumed 2.42 ± 0.08 g/kg on the days of 2h exposure and 5.99 ± 0.20 g/kg on the 4th day. The plasma concentration reached was 135.2 ± 16.0 mg/dl and ethanol consumption did not modify the rectal temperature of the animals. In addition, mice did not alter their food consumption during the 4 cycles and no differences in weight gain were observed between control animals and those exposed to ethanol.

The permeability of the BBB was evaluated in different sections of the hippocampus by immunohistochemical determination of the extravasation of immunoglobulin G (IgG) to the brain parenchyma. An increase in the immunoreactivity to this protein, which is generally not found in the brain parenchyma, is indicative of an increase in BBB permeability. The animals were

subjected to 1 cycle or 4 cycles of DID and killed either immediately after removing the ethanol on the last day of the cycle or 24h later. Ethanol increased IgG extravasation following 1 cycle of exposure in the three brain areas immediately after withdrawal (160.6% in dentate gyrus, 66% in CA1 and 151.5% in CA3) and 24h later (137.9% in dentate gyrus, 179.4% in CA1 and 124.2% in CA3) and similar effects were observed after exposure to 4 cycles immediately after withdrawal (201.6% in dentate gyrus, 66.1% in CA1 and 166.3% in CA3) and 24h later (326.1% in dentate gyrus, 179.4% in CA1 and 128.8% in CA3) reflecting an increase in BBB permeability. Based on these results we next analyzed the expression of the principal proteins which form the basal lamina, laminin and collagen IV. Following 4 cycles of exposure, ethanol reduced laminin expression in CA1 (28.7% immediately after withdrawal and 39.4% at 24h) and CA3 (27.8% immediately after withdrawal and 39.4% at 24h). Collagen expression was reduced after 1 cycle of exposure immediately after withdrawal (66.6% in CA1 and 42.3% in CA3) and 24h later (56.4% in dentate gyrus, 65.2% in CA1 and 76.1% in CA3) and also after 4 cycles of exposure immediately after withdrawal (41.4% in dentate gyrus, 46.9% in CA1 and 47.1% in CA3) and 24h later (56.6% in dentate gyrus, 68.8% in CA1 and 61.7% in CA3).

Considering the changes observed in the basal lamina proteins we studied the proteolytic enzymes which might be responsible for degradation of these proteins. Following both 1 cycle and 4 cycles of exposure and at both of the times studied MMP-9 activity was reduced (for 1 cycle: 34.5% immediately after withdrawal and 20.9% at 24h; for 4 cycles: 20.7% immediately after withdrawal and 28.1% at 24h) and no change was observed in MMP-2 activity. Next, MMP-3 enzymatic activity was determined and an increase was observed following 4 cycles of exposure both immediately after withdrawal (38.9%) and 24h later (31.3%). Similarly, t-PA expression (51% immediately after ethanol withdrawal and 42% at 24h) and activity (93.7% immediately after ethanol withdrawal and 52.2% at 24h) were increased. Taken together these results indicate that MMP-9 and MMP-2 do not appear to be involved in the reduction of laminin and collagen IV expression produced by ethanol but that the changes in the expression of the proteins which form the basal lamina correlate in a temporal

manner with the increase in MMP-3 activity and the increase in expression and activity of t-PA.

Additionally, glial cell response was determined in animals subjected to 1 cycle and 4 cycles of ethanol. There was an increase in astroglial activation 24h after ethanol withdrawal following 4 cycles of DID reflected as an increase in GFAP (14.7% in dentate gyrus, 15.7% in CA1 and 16.9% in CA3) and S100B (11.1% in dentate gyrus, 12.2% in CA1 and 10.5% in CA3) immunoreactivity. In contrast there was no change in the immunostaining of Iba-1, a marker of microglial activation. Using the fluorochrome Fluoro-Jade, which is a specific marker for neuronal death, we observed an increase in staining in the dentate gyrus following 4 cycles of ethanol, both immediately after ethanol withdrawal (113.8%) and 24h later (164.4%).

Recent studies indicate the involvement of Toll-like receptors and in particular of TLR4 in neuroinflammatory and neurodegenerative processes. In the hippocampus of mice subjected to the DID paradigm there was an increase in the expression of the TLR4 immediately after removing the ethanol (23%) and 24h later (22.9%) and an increase in some of the proteins involved in its activation, such as HMGB1, a TLR4 protein ligand, and MyD88, an adaptor protein specific for TLRs. Expression of HMGB1 is increased following 4 cycles of DID both immediately after ethanol withdrawal (23.4%) and 24h later (24.2%). Similar results were observed with the expression of MyD88, where expression was increased immediately after ethanol withdrawal (26.5%) and 24h later (24.4%). Taking into account the effects of ethanol on the expression of TLR4, HMGB1 and MyD88 and on neuronal death, we decided to study the expression of several MAPK. Ethanol did not alter the expression of the phosphorylated form of JNK but did modify the phosphorylation of p-38 (p-p-38) and ERK 1/2 (p-ERK 1/2). The expression of p-p38 increased 24h after exposure to 4 cycles of DID (17.2%) while the expression of p-ERK 1/2 increased immediately after removing the ethanol (32.7%) and 24h later (30.1%). Since the increase in p-ERK is greater and occurs at both time points we studied the subunit c-fos of the AP-1 protein which is directly activated by this kinase. Ethanol increased the expression of this transcription factor immediately after withdrawal (40.7%) and 24h later (26.9%).

To study the involvement of TLR4 in the changes induced by ethanol in BBB permeability, astroglial activation and in neuronal death we repeated the protocol of 4 cycles of DID in TLR4 *Knockout* mice (TLR4-KO) and killed the mice 24h after the removal of ethanol on the 4th day of the cycle. TLR4-KO mice consumed similar amounts of ethanol as those consumed by *WT* mice during the 4 cycles of DID and increased their consumption on the 4th day of each cycle in accordance with the number of hours exposed. In *WT* mice, ethanol increased S100B expression (27.1% in dentate gyrus, 17.1% in CA1 and 24.5% in CA3) and this effect was not observed in TLR4-KO. Similarly, TLR4-KO mice did not show a reduction in laminin nor in collagen IV nor an increase in IgG extravasation, changes which were observed in *WT* mice (laminin: 29.3% in CA1 and 41.7% in CA3; collagen IV: 42.7% in dentate gyrus, 54.4% in CA1 and 55.2% in CA3; IgG: 346.4% in dentate gyrus, 146.6% in CA1 and 312.6% in CA3). In addition, ethanol consumption increased neuronal death in the dentate gyrus (84%) and CA3 (71.5%) in *WT* animals but this effect was not observed in TLR4-KO mice.

Conclusions

Intensive and repeated consumption of ethanol following the DID protocol produces an increase in the permeability of the BBB which shows a temporal association with the reduction in laminin and especially with the reduction in collagen IV which are more evident in the CA1 and CA3. Furthermore, the changes in these BBB parameters do not appear to be related to an increase in MMP-9 and MMP-2 but may be related to the increase in MMP-3 and t-PA activity. Intensive and repeated consumption of ethanol increases astroglial activation and neuronal death and increases TLR4 signalling.

The BBB alterations, astroglial activation and neuronal death induced by ethanol involve TLR4 signalling since they are not observed in the absence of this receptor.

INTRODUCCIÓN

Barrera hematoencefálica

1. Aspectos generales

La Barrera hematoencefálica (BHE) es la interfaz entre el sistema neurovascular y el parénquima cerebral (figura 1). La BHE limita de manera selectiva el intercambio de iones y moléculas orgánicas entre el plasma sanguíneo y el líquido intersticial del tejido cerebral.

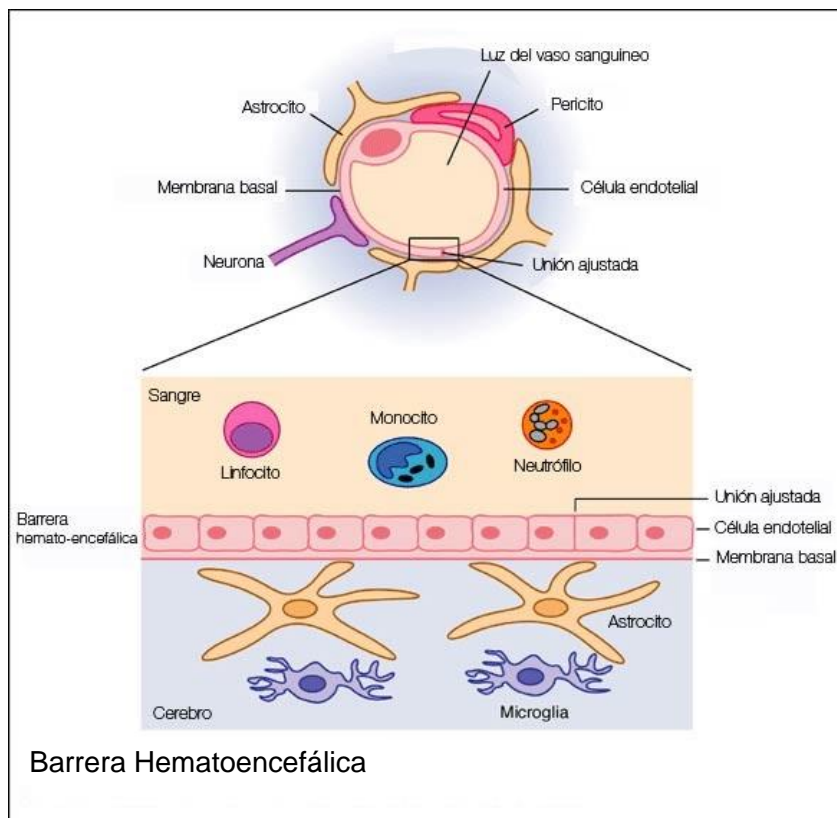


Figura 1: Barrera hematoencefálica (Francis et al., 2003)

Numerosas sustancias fisiológicas y de interés farmacológico, pueden difundir fácilmente a través de la pared de los capilares sanguíneos de los tejidos periféricos pero no pueden atravesar la pared de los capilares sanguíneos cerebrales. La BHE regula la concentración de los compuestos endógenos y exógenos en el tejido nervioso asegurando la homeóstasis de las células cerebrales y evitando el contacto tanto con sustancias

eventualmente dañinas como con agentes terapéuticos (Abbott, 2004). Esto hace que más del 98% de los compuestos de síntesis potencialmente activos a nivel del SNC no puedan atravesar la BHE (Béduneau et al., 2007). A pesar de que el volumen del cerebro ocupado por capilares y células endoteliales es de 1% y 0.1% respectivamente, la microcirculación se extiende en un área de aproximadamente 20m^2 , superficie que, en ausencia de la BHE permitiría a las moléculas pequeñas llegar a las células cerebrales en menos de un segundo porque se encuentran a una distancia del capilar de menos de $20\mu\text{m}$ (Pardridge, 2001).

La característica principal de la BHE es la lipofilia. Dicha característica impide atravesar la BHE a las sustancias hidrófilas (iones y moléculas polares) sin la intervención de algún mecanismo que facilite el paso; lo cual proporciona protección frente a sustancias exógenas y tóxicas a la vez que necesita mecanismos de transporte para los nutrientes hidrófilos necesarios para garantizar el correcto funcionamiento del SNC, como los aminoácidos, nucleótidos, péptidos y especialmente la D-glucosa que es la fuente principal de energía del cerebro, que no atraviesan el endotelio y pasan gracias a transportadores de membrana específicos.

El concepto de BHE fue introducido por Paul Ehrlich (1885) cuando observó que los tintes solubles en agua teñían todos los órganos del cuerpo con excepción del cerebro y la médula espinal. Su explicación fue que el SNC no tenía o tenía muy poca afinidad por los tintes solubles en agua. Años más tarde, Edwin E. Goldmann (1913, discípulo de Ehrlich) demostró que cuando se administraba un tinte azul directamente en el líquido cefalorraquídeo, se teñía todo el SNC pero no se tenían los órganos periféricos. Estos estudios, junto con los de Lewandowsky y Biedl (1898, 1900), en los que se observaba que ciertos tóxicos sólo afectaban al cerebro cuando se inyectaban directamente en el mismo, demostraron la existencia de una barrera física que separaba el SNC de la circulación sanguínea. Pero pese a que se conocía la existencia de la BHE, no fue hasta la llegada del microscopio electrónico, cuando fue posible correlacionarla con las células endoteliales y capilares del cerebro y estudiar la diferente permeabilidad de los capilares cerebrales en relación con su estructura (Reese y Karnovsky, 1967). Reese y colaboradores observaron que tras la inyección del trazador electro denso

HRP (del inglés *Horseradish Peroxidase* o peroxidasa de rábano), que es una pequeña proteína de 40kDa, ésta difundía entre las hendiduras intercelulares del endotelio cerebral hasta llegar a las uniones estrechas entre las células endoteliales. En los vertebrados, por tanto, estas uniones estrechas fueron consideradas como el correlato morfológico de la BHE. Esta barrera permite la formación de un ambiente extracelular alrededor de las células del SNC (neuronas, astrocitos, pericitos) con una composición finamente controlada. Este fluido extracelular incluye el fluido cerebroespinal, o líquido cefalorraquídeo (LCR) y el fluido intersticial cerebral, que están entre los ventrículos del cerebro y los espacios cerebrales y espinales subaracnoideos (Begley, 2004). Es importante recordar que no todo el SNC está protegido por la BHE como por ejemplo los órganos circunventriculares (órgano vascular de la lámina terminal en la eminencia media, órgano subfornical, área postrema, neurohipófisis y la glándula pineal) debido a que en estas áreas existen capilares fenestrados que permiten el paso de la mayoría de las moléculas. El área con capilares fenestrados es pequeño respecto al área total de la BHE haciendo despreciable la alta permeabilidad de estas áreas en comparación con la capacidad del endotelio cerebral de actuar como barrera (Begley, 1996; Osculati et al., 1995).

2. Transporte celular en la BHE

La formación de uniones estrechas elimina de manera eficaz el transporte paracelular a través de la BHE (Cecchelli et al., 2007; Giacomini et al., 2010).

El transporte transcelular puede realizarse por varias rutas como la difusión pasiva, los transportadores ABC (del inglés *ATP binding cassette*), los transportadores SLC (del inglés *solute carrier*), la transcitosis y la migración de las células mononucleares (Abbott et al., 2010; Cecchelli et al., 2007; de Boer et al., 2003; Giacomini et al., 2010; Ohtsuki y Terasaki, 2007; Ueno, 2009).

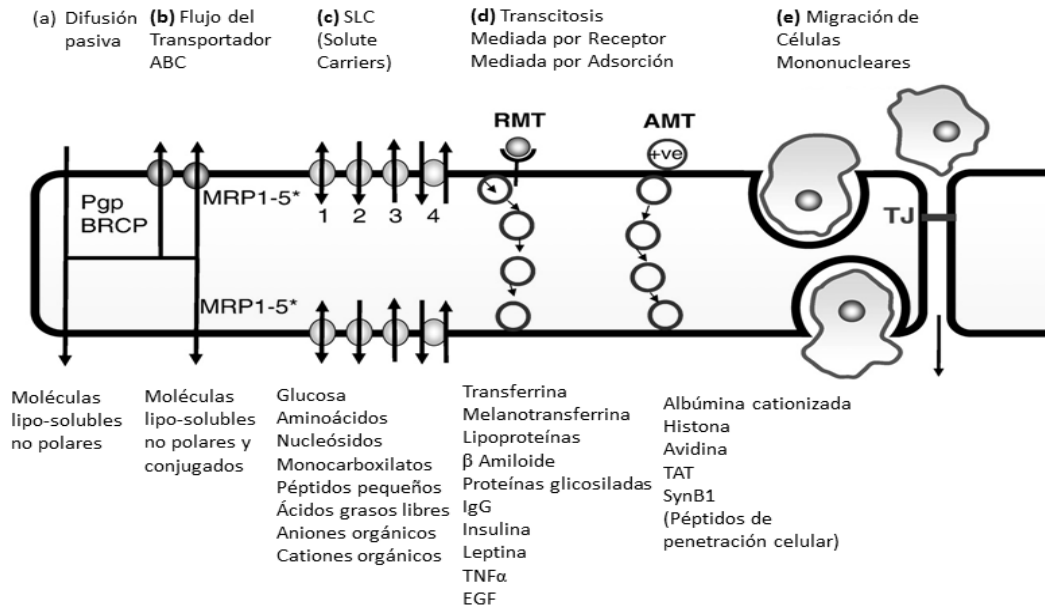


Figura 2: Principales rutas de transporte a través de la BHE (Abbott et al., 2010)

Existen moléculas lipófilas de pequeño tamaño que pueden penetrar en el cerebro mediante difusión pasiva y otras moléculas polares, como glucosa, aminoácidos, aniones y cationes orgánicos y nucleósidos que pueden atravesar la BHE mediante transporte mediado por proteínas transportadoras. Por otra parte, las moléculas de mayor tamaño, como proteínas y péptidos cruzan la barrera mediante transportadores específicos o por endocitosis. Se ha observado que el 10-15% de todas las proteínas en la unidad neurovascular son transportadores (Enerson y Drewes, 2006).

Como resultado de este transporte regulado pueden existir grandes diferencias en la concentración de aminoácidos y proteínas entre sangre y líquido cefalorraquídeo, mientras que las diferencias de la concentración de iones son relativamente pequeñas (Abbott et al., 2006).

Los transportadores ABC actúan principalmente como transportadores de bombeo, usando energía para expulsar de manera activa moléculas tóxicas y limitar su entrada al cerebro. Los transportadores SLC en cambio captan moléculas que son necesarias para el correcto funcionamiento del cerebro como glucosa o aminoácidos.

Los transportadores ABC representan un desafío en la farmacoterapia de enfermedades del SNC puesto que restringen la entrada y la acumulación de los fármacos en el cerebro (Hermann y Bassetti, 2007) y parecen ser de gran importancia en la función normal de órganos y tejidos ya que mutaciones en estas proteínas pueden causar enfermedades genéticas (Albrecht et al., 2005; Martínez-Mir et al., 1998). En el cerebro, los transportadores ABC se expresan principalmente en las células endoteliales (Demeule et al., 2001; Soontornmalai et al., 2006). La regulación de los transportadores ABC es muy compleja y los mecanismos moleculares que controlan su expresión fisiológica se conocen muy poco. En el SNC se expresan varios transportadores ABC, como Mdr-1 (también conocido como P-glicoproteína, o ABCB1) o Mrp-1 (también conocido como ABCC1), cuya función sería prevenir la captación de compuestos tóxicos y facilitar su eliminación (Borst y Elferink, 2002; Löscher y Potschka, 2005a). Las condiciones patológicas del SNC juegan un papel importante en la expresión de los transportadores ABC, en su función, y en su distribución. Así pues, en algunas enfermedades del SNC, se ha encontrado que los transportadores ABC se expresan en neuronas, astrocitos, y microglía además de en las células endoteliales (Lee et al., 2001; Pardridge et al., 1997; Seegers et al., 2002).

Los transportadores ABC tienen afinidad por sustratos lipófilos y anfipáticos como por ejemplo las toxinas bacterianas, vegetales, y fúngicas, y por las sustancias carcinógenas, por lo que, se consideran sistemas de detoxificación (Leslie et al., 2005). En algunos órganos como el cerebro o los testículos la función de los transportadores ABC es protegerlos de compuestos tóxicos. La función fisiológica precisa del transportador ABCB1 no se conoce todavía, pero se sabe que protege a los órganos de xenobióticos tóxicos. Algunos estudios mostraron que otras funciones de este transportador podrían ser el transporte de fosfolípidos y glicoesfingolípidos simples de la membrana plasmática al espacio extracelular (Orlowski et al., 2006; Sharom et al., 2005). El transportador ABCB1 puede contribuir también a la eliminación del péptido hidrófobo A β asociado a membrana (Burk et al., 2005; Vogelgesang et al., 2004). De la misma manera que para el ABCB1, la función fisiológica exacta del ABCC1 sigue sin conocerse exactamente. Se ha sugerido que podría ser un

transportador del leucotrienos C₄ (LTC₄) debido a la alta afinidad que tiene por ellos, y a la reducida liberación de LTC₄ por parte de eosinófilos y mastocitos en condiciones inflamatorias en ratones *knock out* de ABCC1 (Wijnholds et al., 1997). También se ha sugerido que este transportador funciona como un destoxicador celular, ya que se ha demostrado que en animales *knock out* de ABCC1 el paso de sustancias de la sangre al fluido cerebroespinal está incrementado respecto a los animales *wild type* (Wijnholds et al., 2000). Bajo condiciones patológicas, varias rutas de señalización inespecíficas han sido involucradas en la regulación de estas proteínas. Entre ellas JNK1/2, p38, ERK 1/2, PKC, Akt, NFκB, y COX-2 regulan al alza la expresión de ABCB1 (Bauer et al., 2007; Hartz et al., 2008; Nwaozuzu et al., 2003; Zhou et al., 2006), mientras que p-53 regula a la baja la expresión de ABCC1 (Wang y Beck, 1998).

3. Regulación de los neurotransmisores y macromoléculas.

El plasma sanguíneo contiene altos niveles del aminoácido glutamato, que es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Estos niveles pueden incrementar notablemente, por ejemplo tras la ingesta de comida, e inducir situaciones perjudiciales. Si el glutamato fuera liberado de una forma incontrolada al líquido intersticial cerebral se produciría un daño neurotóxico, como tiene lugar en hipoxia tras un infarto isquémico, lo cual no ocurre debido a la BHE que separa el SNC del sistema nervioso periférico (SNP) (Abbott et al., 2006; Bernacki et al., 2008).

La BHE también previene la entrada libre de macromoléculas en el cerebro. El contenido proteico, de aminoácidos y de glucosa del LCR es menor que el del plasma, y como se puede observar en la tabla 1, la composición individual de las proteínas, de los aminoácidos y de la glucosa es marcadamente distinta entre los dos. Las proteínas plasmáticas como albúmina, protrombina y plasminógeno, dañan el tejido nervioso; causan activación de diferentes tipos celulares que pueden llevar a la apoptosis (Gingrich et al., 2000; Gingrich y Traynelis, 2000; Nadal et al., 1995). El

factor Xa (implicado en la conversión de pro-trombina a trombina), el receptor de trombina PAR₁ y el t-PA (convierte el plasminógeno en plasmina) se expresan abundantemente en el cerebro. Esto implica que si aparecen en el fluido intersticial la protrombina y el plasminógeno, son convertidos en trombina y plasmina y pueden iniciar cascadas de señalización que llevan a activación y división glial, fibrosis, y finalmente, la muerte celular (Gingrich y Traynelis, 2000) Por tanto, la entrada de estas moléculas séricas de alto peso molecular al parénquima cerebral a través de una BHE dañada puede tener importantes consecuencias patológicas.

Una de las escasas proteínas que se encuentran en mayor concentración en el LCR que en el plasma es la cistatina-C (tabla 1), la cual es un inhibidor de serin-proteasas que se sintetiza en el SNC y puede ser una medida protectora frente a micro-roturas en la BHE (Reiber, 2001). Estas micro-roturas ocurren de manera natural y de forma continua y sin la presencia de la cistatina-C permitirían el paso de los componentes plasmáticos al cerebro lo que variaría su composición interna.

Soluto	Unidades	Plasma	LCR	Ratio
Glucosa	mM	5	3	0,6
Aminoácidos totales	μM	2890	890	0,31
Leucina	μM	109	10,1–14,9	0,10–0,14
Arginina	μM	80	14,2–21,6	0,18–0,27
Glicina	μM	249	4,7–8,5	0,034
Alanina	μM	330	23,2–32,7	0,07–0,1
Serina	μM	149	23,5–37,8	0,16–0,25
Ácido glutámico	μM	83	1,79–14,7	0,02–0,18
Taurina	μM	78	5,3–6,8	0,07–0,09
Proteína total	mg/ml	70	0,433	0,006
Albúmina	mg/ml	42	0,192	0,005
IgG	mg/ml	9,87	0,012	0,001
Transferrina	mg/ml	2,6	0,014	0,005
Plasminógeno	mg/ml	0,7	0,000025	0,00004
Fibrinógeno	mg/ml	325	0,00275	0,000008
α2-macroglobulina	mg/ml	3	0,0046	0,0015
Cistatina-C	mg/ml	0,001	0,004	4

Tabla 1: : Composición proteica, aminoacídica y de glucosa del plasma y el LCR (Summerfield et al., 2007)

4. Regulación de la homeostasia iónica

La BHE no sólo permite un ambiente estable para la función neuronal, sino que además, mediante una combinación de canales iónicos específicos, así como de transportadores, mantiene la composición iónica óptima para la función de señalización sináptica.

La concentración aproximada de potasio en el plasma de los mamíferos es de aproximadamente 4.5 mM, mientras que en el LCR y en el fluido intersticial cerebral se mantiene aproximadamente en 2.5 – 2.9 mM aunque se produzcan cambios en las concentraciones de potasio plasmático, debidos a la comida, ejercicio, alteraciones experimentales o resultantes de alguna patología (BRADBURY et al., 1963; Summerfield et al., 2007).

De igual manera el calcio, el magnesio y el pH son regulados activamente por la BHE y barrera hematoliquoral (BHE-LCR; tabla 2; (BRADBURY et al., 1963; Jeong et al., 2006).

Soluto	Unidades	Plasma	LCR	Ratio
Na ⁺	mM	140	141	≈1
K ⁺	mM	4,6	2,9	0,63
Ca ⁺⁺	mM	5	2,5	0,5
Mg ⁺⁺	mM	1,7	2,4	1,4
Cl ⁻	mM	101	124	1,23
HCO ₃ ⁻	mM	23	21	0,91
Osmolaridad	mOsmol	305,2	298,5	≈1
pH		7,4	7,3	

Tabla 2: Composición iónica del plasma y del LCR (modificado de Begley, 2007).

5. Estructura de la BHE

5.1 Unidad neurovascular

La BHE está compuesta por una unidad funcional denominada unidad neurovascular (Abbott et al., 2006). Esta unidad está formada por una matriz extracelular, células endoteliales, pericitos, astrocitos, microglía y neuronas.

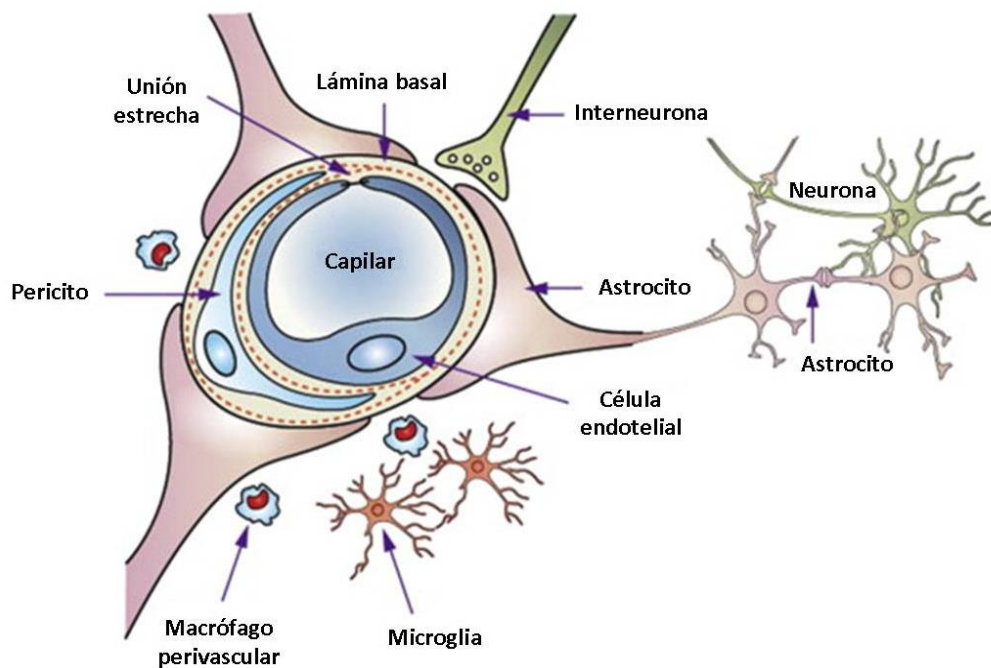


Figura 3: Representación esquemática de la unidad neurovascular (Abbott et al., 2006).

5.2 Células endoteliales

Las células endoteliales que forman la BHE difieren de otras células endoteliales en que poseen una gran cantidad de mitocondrias (Oldendorf, 1977), una tasa muy baja de endocitosis (Ballabh et al., 2004), ausencia de membranas fenestradas (Fenstermacher et al., 1988) y una baja actividad pinocítica basal (Sedlakova et al., 1999).

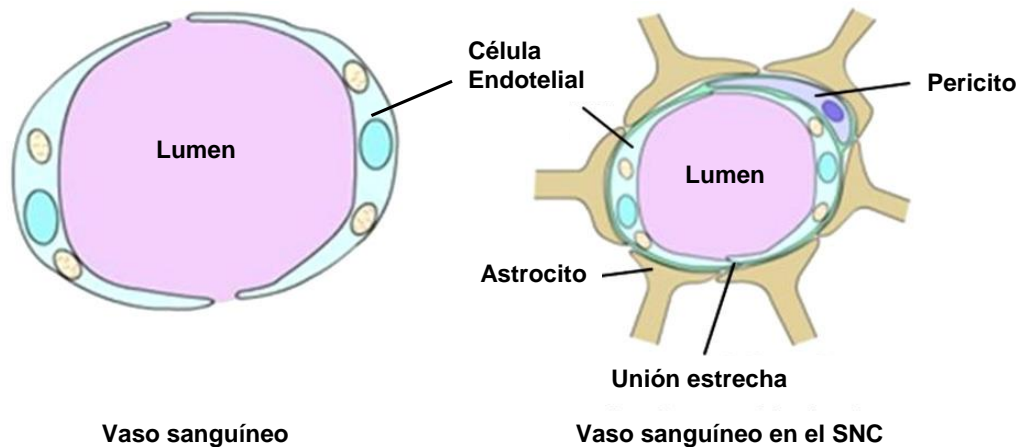


Figura 4: Comparación entre un vaso sanguíneo no cerebral y otro del SNC (Palmer, 2010).

Las células endoteliales que recubren la microvasculatura en el cerebro definen la interfaz entre el sistema vascular y el cerebro. Estas células funcionan como dispositivos adaptables de entrada/salida no lineal de las fuerzas biomecánicas y bioquímicas que modifican, en el microambiente local de la unidad neurovascular, la morfología celular, la expresión de proteínas, la expresión génica, la proliferación, el transporte, etc (Abid et al., 2007; Aird, 2005; Dejana, 2004). Aparte de ser responsables de la entrada de señales bioquímicas y biomecánicas desde el sistema vascular, son garantes del mantenimiento de la BHE y de numerosas vías de señalización paracrina entre astrocitos, células endoteliales microvasculares y pericitos (Abbott et al., 2010; Abid et al., 2007). En la microvasculatura cerebral, las uniones estrechas célula-célula son la clave para el mantenimiento de la integridad de los capilares y la regulación del transporte paracelular. La adhesión célula-célula se logra mediante la formación de uniones adherentes y uniones estrechas, *tight junctions* (Abid et al., 2007; Bazzoni y Dejana, 2004; Dejana, 2004). Las uniones estrechas impiden el transporte paracelular de la mayoría de las grandes moléculas y limitan de manera selectiva el intercambio de pequeñas moléculas y de iones. Por lo tanto, el transporte transcelular es responsable de la mayor parte del tráfico molecular entre el sistema vascular y el cerebro. Las uniones estrechas se forman entre la ocludina (Nitta et al., 2003) y proteínas de la familia de las claudinas (Furuse y Tsukita, 2006; Hawkins y Davis, 2005). La familia de las

claudinas consta de más de 20 proteínas esenciales para la formación de las uniones estrechas. La proteína claudina-5 es la isoforma más común en la BHE (Hewitt et al., 2006; Nitta et al., 2003; Yokogawa et al., 1999), aunque también participan las proteínas claudina-1 y claudina-12 (Abbott et al., 2006; Wolburg y Lippoldt, 2002). Estas proteínas están reguladas por varios procesos, entre los cuales destaca la fosforilación tanto de ocludina como de claudina-5 (Hirase et al., 2001; McCarthy et al., 1996). Dichas fosforilaciones se producen en los residuos de serina, treonina y tirosina e influyen directamente sobre la integridad de la BHE, ya que modulan el ensamblaje, disociación y localización celular de dichas proteínas (Andreeva y Kutuzov, 2001; Ruan et al., 2002).

Los cambios en la expresión o en la fosforilación de ocludina se han observado en varios modelos en los que se daña la BHE. Por ejemplo, en un modelo de esclerosis múltiple, la desfosforilación de ocludina precede a los cambios visibles en la BHE (Morgan et al., 2007).

Estas proteínas de membrana están conectadas con la proteína actina del citoesqueleto mediante moléculas adaptadoras que son las proteínas de la zonula occludens (ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (Hawkins y Davis, 2005). Estas proteínas de anclaje entre el citoesqueleto y las uniones estrechas transmembrana controlan la correcta distribución espacial de las claudinas a través de sus dominios de unión PDZ (Zlokovic, 2008). En varios modelos en los que se observa la rotura de la BHE, la función o la expresión de ZO-1 están alteradas. En diferentes modelos de esclerosis múltiple, se han observado anomalías en las uniones estrechas que están relacionadas con disminuciones en la expresión de ZO-1 (Kirk et al., 2003).

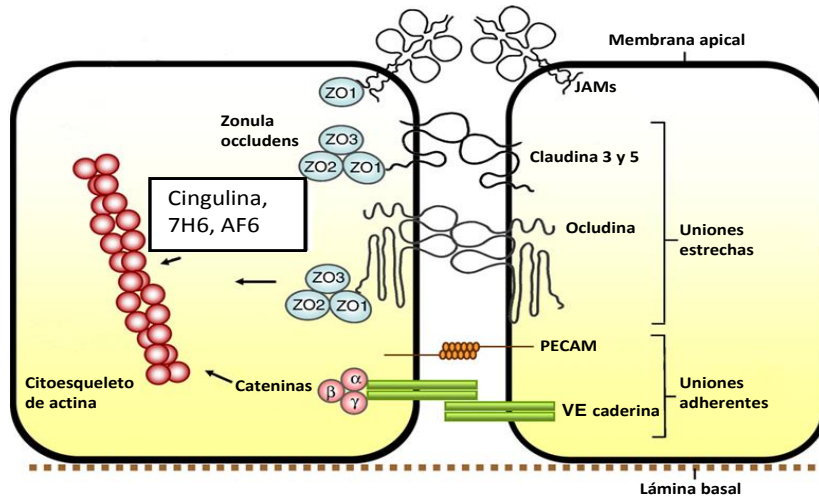


Figura 5: Componentes moleculares de las uniones estrechas y adherentes entre células endoteliales que constituyen la unidad neurovascular (Abbott et al., 2010).

5.3 Pericitos

Los pericitos envuelven los microvasos y los capilares en el cerebro (Dalkara et al., 2011; Fisher, 2009; Hamilton et al., 2010; Krueger y Bechmann, 2010; Miller y Sims, 1986; Winkler et al., 2011) y comunican con las células endoteliales, astrocitos y neuronas en la unidad neurovascular (Bonkowski et al., 2011).

Morfológicamente los pericitos tienden a alinearse con el eje del vaso sanguíneo y se extienden a lo largo de las protuberancias que envuelven los capilares (Bonkowski et al., 2011). Una fina capa de membrana basal separa los pericitos de las células endoteliales y de los pies astrocitarios. Los pericitos son células contráctiles y contribuyen a la regulación del flujo sanguíneo controlando el diámetro capilar (Dalkara et al., 2011; Hamilton et al., 2010; Peppiatt et al., 2006).

Estudios en ratón han demostrado que los pericitos son reclutados durante el desarrollo desde los capilares nacientes (Daneman et al., 2009, 2010) y son fundamentales para el desarrollo de la BHE y para la regulación del transporte a través de la BHE (Armulik et al., 2005; Kim et al., 2009). De hecho, la pérdida de pericitos induce una disminución del flujo sanguíneo y la ruptura de la BHE (Armulik et al., 2010; Bell et al., 2010).

5.4 Astrocitos

Los astrocitos participan en múltiples procesos en el cerebro incluyendo la regulación de la concentración de iones y agua, la liberación de neurotransmisores, la proliferación de células madre, el control del número de sinapsis y el mantenimiento de la BHE (Abbott et al., 2006; Fiacco et al., 2009; Freeman, 2010; Halassa y Haydon, 2010; Lee et al., 2003; Ullian et al., 2001) Morfológicamente, los astrocitos son estrellados con proyecciones que se extienden desde el cuerpo celular, con un diámetro total de 140 μm en el cerebro humano.

Los astrocitos interactúan con la células endoteliales microvasculares a través de sus extremos, los terminales astrocitarios, que envuelven el capilar (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006) y cada astrocito puede comunicarse con múltiples capilares (Oberheim et al., 2009).

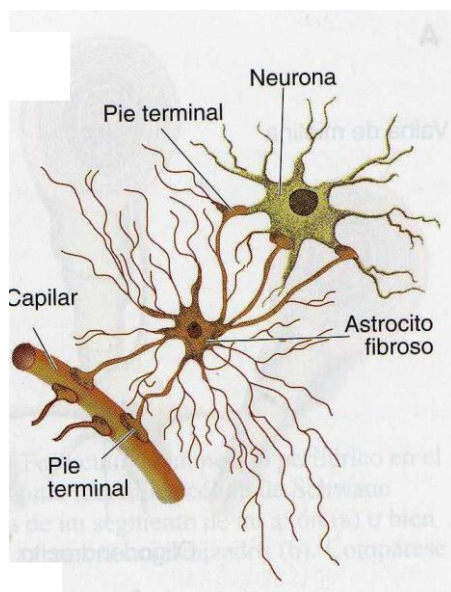


Figura 6: Interacción entre astrocitos y capilares.

Los astrocitos desempeñan un importante papel en la regulación del transporte de oxígeno y glucosa para la actividad neuronal a través de la regulación del flujo sanguíneo local (Iadecola y Gorelick, 2004; Iadecola y Nedergaard, 2007; Takano et al., 2006; Zonta et al., 2003). Las células astrogliales participan en la formación de la BHE mediante el fortalecimiento

de la unión estrecha, la modulación de la expresión y polarización de los transportadores y la producción de las enzimas especializadas (Abbott, 2002; Abbott et al., 2006; DeBault y Cancilla, 1980; Haseloff et al., 2005; Janzer y Raff, 1987; Lee et al., 2003). Además, varios factores secretados desde los astrocitos como el factor neurotrófico derivado de célula glial (GDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y la angiotensina-1 (ANG-1) inducen en las células endoteliales las características que las transforman en células endoteliales de la BHE (Abbott et al., 2006; Haseloff et al., 2005). Las conexiones astrogliales son necesarias para mantener la integridad de la BHE (Ezan et al., 2012). Se ha demostrado en estudios en cultivos que los astrocitos secretan metaloproteinasas 9 (MMP-9; (Hsieh et al., 2014; Lin et al., 2012; Lu y Lai, 2013; Yang et al., 2013) y MMP-2 (Lu y Lai, 2013) y la expresión de MMP-3 se restringe en gran parte a los astrocitos (Zhou et al., 2005; Zhou et al., 2003). Estudios en cultivo han demostrado que la expresión de MMP-3 en astrocitos aumenta con el aumento de la liberación de calcio (Neria et al., 2013) y con el ácido poliriboinosínico-poliribocitidílico (del inglés *polyriboinosinic–polyribocytidilic acid*) que imita la activación inmune por infecciones virales.

5.5 Microglía

El papel de la glía perivascular parece ser dual. Estas células de origen monocítico presentan antígenos y secretan señales que guían la transmigración de los leucocitos desde la sangre al cerebro (Man et al., 2007). En patologías neuroinflamatorias como encefalitis causada por el VIH, esclerosis múltiple o enfermedad de Alzheimer, se produce la apertura de la BHE y la ruptura de las uniones estrechas (Avison et al., 2004; Persidsky et al., 2006). Bajo estas condiciones, los fagocitos mononucleares provenientes de la sangre y la microglía secretan citoquinas, quimioquinas, especies reactivas de oxígeno (ROS) y MMPs, que pueden alterar la expresión y función de las uniones estrechas (Persidsky y Gendelman, 2003). Por tanto, parece que la microglía amplifica la señal inflamatoria llevando a la disfunción de la BHE mediante el reclutamiento de leucocitos (Persidsky et al., 2006) o por alteraciones en las células endoteliales cerebrales

(Stamatovic et al., 2005). Sin embargo, la microglía perivascular podría tener un papel protector. Se ha observado que se produce un descenso de la permeabilidad paracelular de las células endoteliales al realizar cultivos mixtos con microglía perivascular (Zenker et al., 2003). Por otra parte, en un modelo de enfermedad de Alzheimer se ha descrito que los ratones deficientes en la quimioquina microglial Ccr2, la cual media la acumulación de fagocitos mononucleares en los sitios de inflamación, sufren un agravamiento en la enfermedad (El Khoury et al., 2007). Así pues la microglía se comporta de manera dual y depende de las condiciones ambientales si su función es protectora o deletérea.

5.6 Lamina basal o matriz extracelular

La lámina basal es una parte esencial de la BHE. Constituye la matriz extracelular que rodea y da soporte físico a las células endoteliales y pericitos, mejora la formación de las uniones estrechas (Hartmann et al., 2007; Tilling et al., 1998) y establece conexiones con otras células del cerebro (Carvey et al., 2009). El espesor de la membrana basal observado en el microscopio electrónico es aproximadamente de 100 nm. Las células endoteliales, los astrocitos y los pericitos contribuyen a la formación de la lámina basal mediante la secreción de moléculas de la matriz extracelular. De hecho los vasos sanguíneos están rodeados por dos capas de lámina basal: la membrana basal endotelial en el interior y la membrana basal del parénquima exterior. La primera se secreta desde las células endoteliales y desde los pericitos (Sorokin, 2010). La membrana basal del parénquima se secreta desde los astrocitos y los pies astrocitarios a través de la interacción proteína-proteína mediadas en parte por el distroglicano (receptor que asegura la conexión entre los elementos del citoesqueleto y la matriz extracelular; (Agrawal et al., 2006). En el SNC no hay necesidad de generar altos niveles de tracción o fuerza elástica porque el cerebro está protegido por el cráneo. Por lo tanto, hay pocas proteínas fibrosas, como el colágeno I y III o la fibronectina y pequeñas cantidades de cadenas de glicosaminoglicanos. Se compone principalmente de proteínas estructurales como la laminina (Aumailley et al., 2005), el colágeno tipo IV, el nidogen, (Hartmann et al., 2007; Tilling et al., 1998) y proteoglicanos de heparán

sulfato (Farkas y Luiten, 2001), aparte de numerosas otras glicoproteínas presentes en menor concentración.

La laminina y el colágeno IV se sintetizan en el interior de las células endoteliales, pericitos y astrocitos (Daneman, 2012) donde las diferentes subunidades se unen para formar la unidad funcional tanto de la laminina (trímeros; figura 7A) como del colágeno IV (protómero; figura 7B). Una vez formada la unidad funcional, se secreta en el exterior de la célula donde los trímeros de laminina polimerizan y se asocian a los protómeros de colágeno IV (Kalluri, 2003).

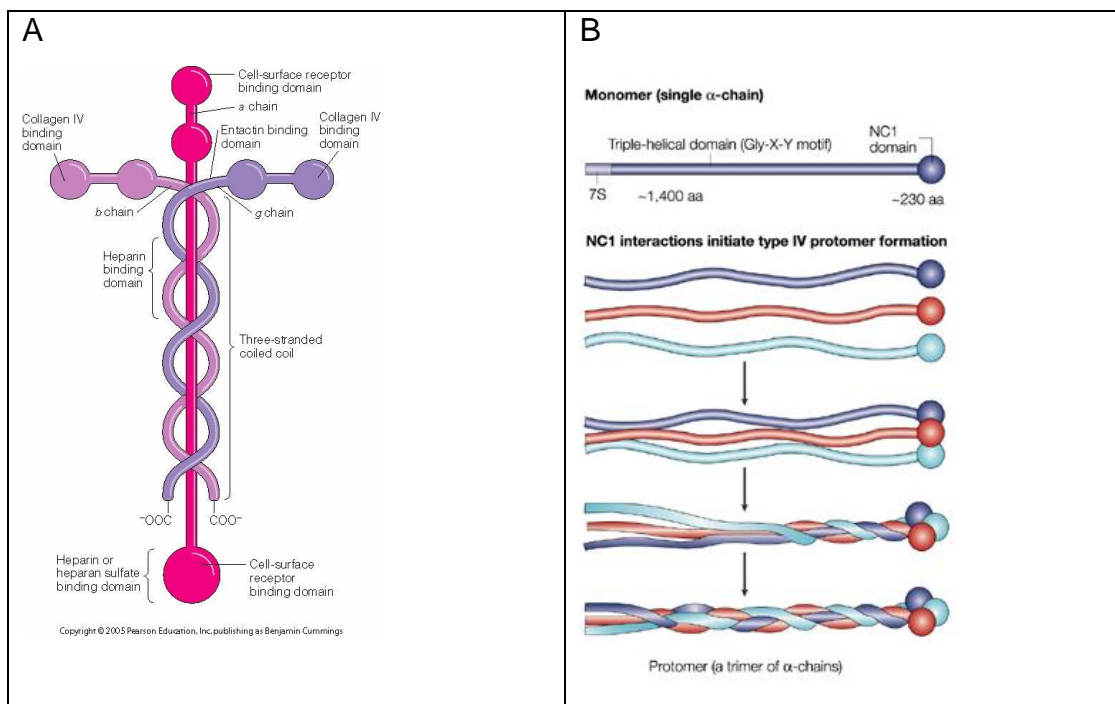


Figura 7: Estructura funcional de la laminina, trímero (A) y del colágeno IV, protómeros (Kalluri, 2003).

La alteración de la matriz extracelular se ha asociado estrechamente con el aumento de permeabilidad de la BHE en varias condiciones patológicas como en la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (Carvey et al., 2009; Hawkins y Davis, 2005; Zlokovic, 2008).

6. Metaloproteinasas

Entre los factores clave que controlan la permeabilidad de la BHE se encuentran las enzimas metaloproteinasas de matriz (MMPs) que se ocupan principalmente de la remodelación de la matriz extracelular (Candelario-Jalil et al., 2009) y que operan una actividad proteolítica específica en la mayoría de los constituyentes de la matriz extracelular (Nagase et al., 2006).

Las MMPs son una familia de endopeptidasas zinc-dependiente y se producen principalmente en las células del tejido conectivo que la secretan como zimógenos en la matriz extracelular (figura 8).

Una enzima MMP tiene una estructura formada por un predominio amino-terminal de 80 aminoácidos, un sitio catalítico (con mínimo dos iones de calcio y dos iones de zinc) de aproximadamente 170 aminoácidos, un péptido enlazador de longitud variable (llamado región bisagra) y un dominio *C-terminal* estructuralmente similar a la hemopexina (*hemopexin-like*) de más o menos 200 aminoácidos (Nagase et al., 2006).

La mayoría de las MMPs se secretan en forma de precursor inactivo que a través de activación proteolítica, fuera de la célula, se convierte en activo, excepto estromelisina-3 y MT1-MMP (*membrane type-1 matrix metalloproteinase*) que se activan dentro de la célula). La activación de MMP depende y está regulada por un mecanismo complejo llamado secuencia activadora de cisteína (*cysteine-switch*) en la cual una cisteína, altamente conservada, se une al propéptido con zinc presente en el dominio catalítico y bloquea el sitio activo del enzima, manteniéndolo en su estado latente (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990; Visse y Nagase, 2003). La activación *in vivo* es generalmente enzimática a través de enzimas proteolíticas (figura 8) incluyendo la plasmina y otras MMPs (Visse y Nagase, 2003). *In vitro* generalmente se activan a través de pH ácido, calor, o productos químicos como el acetato de aminofenil mercurio (APMA) (Springman et al., 1990; Visse y Nagase, 2003).

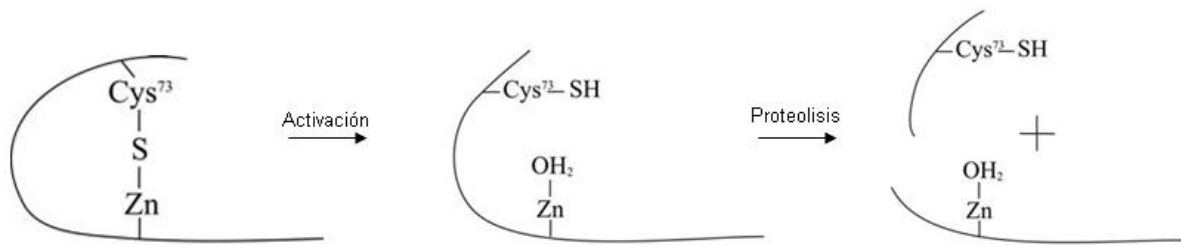


Figura 8: Representación esquemática de la activación de las MMPs (Snoek-van Beurden y Von den Hoff, 2005).

Una vez activadas dichas proteínas regulan gran cantidad de procesos fisiológicos y patológicos. En un tejido sano la degradación y la síntesis de componentes de la matriz extracelular deben estar en un equilibrio mutuo. Un nivel moderado de expresión de ciertas moléculas con actividad enzimática como las MMPs es necesario para el mantenimiento del equilibrio y para la respuesta a estímulos endógenos o exógenos tanto fisiológicos como patológicos. Citoquinas inflamatorias, hormonas, factores de crecimiento e interacciones célula-célula y célula-matriz modulan la expresión de estas moléculas a través de cambios en los niveles de transcripción (Oh et al., 2009). Además, su actividad está regulada por activadores locales, tales como la plasmina, y por inhibidores tisulares específicos de MMP (TIMP; Wang et al., 2010). Entre las funciones de las MMPs, estas incrementan la permeabilidad de la BHE digiriendo la matriz extracelular, la lámina basal, y las uniones estrechas de las células endoteliales (Rosenberg, 2009). La remodelación de la matriz extracelular afecta directamente a la célula modificando su metabolismo, su expresión génica e incluso su morfología. Esto es debido a que las proteínas que la conforman pueden estar en contacto directo con la superficie celular la cual expresa receptores específicos para dichas proteínas.

6.1 Clasificación

Se han identificado 24 diferentes metaloproteinasas, clasificadas en 5 clases principales según la secuencia de aminoácidos y en función de las características bioquímicas de su sitio activo: gelatinasas (MMP-2, MMP-9),

colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13), stromelisininas (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metaloproteinasas de membrana (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP, MT4-MMP) y matrilisininas (MMP-7, MMP-26). Las gelatinasas más estudiadas son la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9). En el cerebro MMP-2 y MMP-9 son las que más contribuyen a la degradación de la BHE (Thanabalasundaram et al., 2010). Las gelatinasas degradan moléculas de la matriz extracelular y la lámina basal alrededor de los capilares de la BHE, facilitan la angiogénesis y la neurogénesis y contribuyen a la aparición de muerte celular. La gelatinasa 2 es constitutiva y se expresa en astrocitos. Sin embargo la gelatinasa 9 es inducible y se expresa en neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales.

Las stromelisininas (MMP-3, MMP-10, MMP-11) son pequeñas proteasas que se secretan y degradan componentes de la matriz extracelular. La stromelisinina-1, también conocida como MMP-3 tiene un amplio espectro de acción. Es capaz de degradar los proteoglicanos, colágeno III, IV, V y IX, laminina, fibronectina, gelatina y elastina y otros miembros activos de la familia de las MMPs, tales como la colagenasa.

Recientemente se ha encontrado una función intracelular para la MMP-3 relacionándola con la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas (Park et al., 2005).

7. Plasminógeno, plasmina y sus activadores.

La familia de las MMPs no son las únicas enzimas proteolíticas que se ocupan de la degradación de la matriz extracelular. Las serina proteasas tisulares tienen la misma función (Streuli, 1999). Una serina proteasa que forma parte del sistema de activación plasminógeno/plasmina es la plasmina. El organismo no produce directamente esta enzima sino que sintetiza su precursor inactivo, el plasminógeno, que se activa por diversas sustancias incluyendo el activador tisular del plasminógeno (t-PA). La plasmina es una enzima proteolítica que actúa sobre varios componentes de la matriz extracelular como son: la fibrina, el colágeno tipo IV y V, fibronectina, laminina y proteoglicanos (Ichinose et al., 1986); y media

indirectamente la degradación de la matriz extracelular por la activación de ciertas MMPs (figura 9), entre ellas MMP-3, MMP-9, MMP-12 y MMP-13 (Carmeliet et al., 1997) que degradan colágenos tipo III y IV, pro-colágeno tipo I, fibronectina, proteoglicanos y laminina, entre otros (Sternlicht y Werb, 2001).

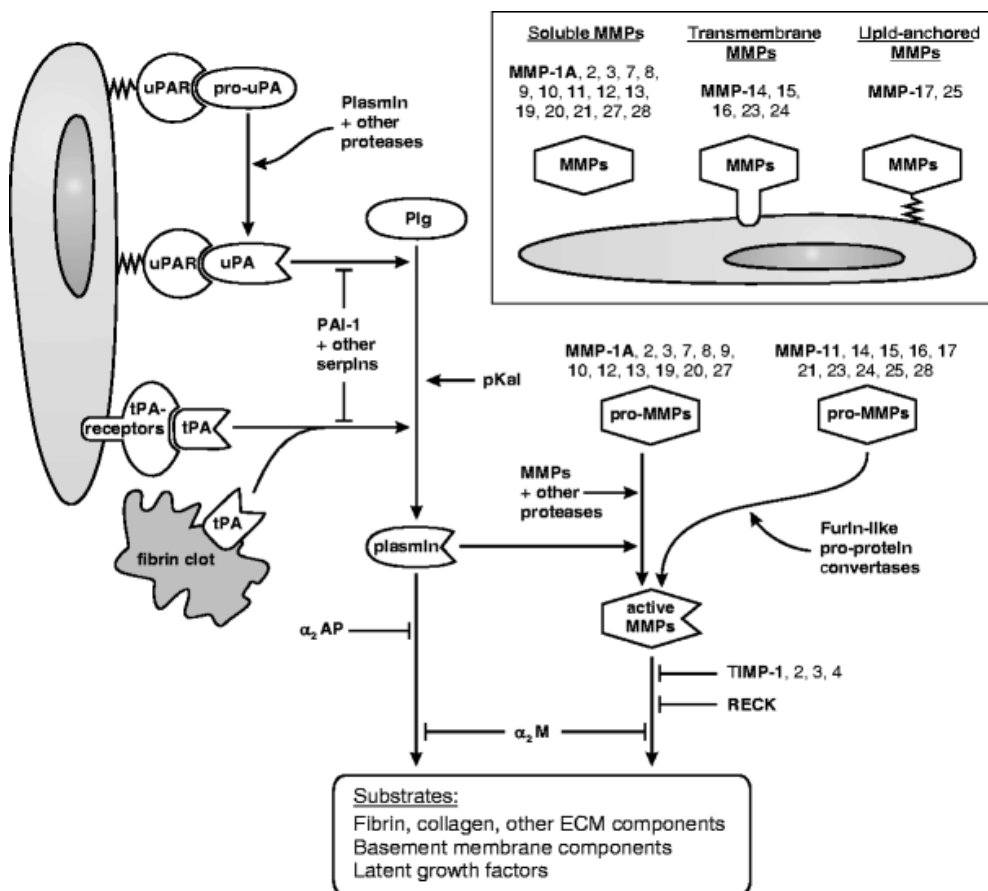


Figura 9: Acción directa e indirecta de la plasmina sobre componentes de la lámina basal (Almholt et al., 2007).

El sistema plasminógeno/plasmina participa también en procesos biológicos como la fibrinólisis, la regeneración tisular, ciclo menstrual, implantación embrionaria e invasión tumoral (Liu et al., 1999).

La plasmina deriva de otra proteína denominada plasminógeno que de forma natural se encuentra en el plasma sanguíneo. El plasminógeno se activa por los activadores del plasminógeno (PAs) como activador del plasminógeno

tipo urocinasa (u-PA) y el activador tisular del plasminógeno (t-PA), los cuales efectúan una proteólisis parcial de la proteína para convertirla en plasmina activa (Andreasen et al., 1997).

Al igual que la plasmina, u-PA y t-PA son serina proteasas, pero a diferencia de la plasmina, tienen una especificidad de sustrato muy restringida al plasminógeno, hecho que hace que sean los principales activadores de plasminógeno. U-PA y t-PA son los productos de genes separados que son regulados de forma independiente por una variedad de factores, incluyendo las hormonas y citoquinas. Modificaciones de la expresión de t-PA son fundamentales en la respuesta del estrés metabólico (Wu et al., 2013) y están relacionadas con patologías neurológicas como la esquizofrenia (Hoirisch-Clapauch y Nardi, 2013). A lo largo de la cascada de proteasas existen puntos adicionales de regulación proporcionados por la existencia de múltiples inhibidores fisiológicos específicos, tales como, los inhibidores de plasmina α 2-antiplasmina (α 2-AP), inhibidores de la actividad proteolítica de la trombina (TAIF, inhibidor de la fibrinólisis activado por trombina), inhibidores del plasminógeno (Inhibidor del activador del plasminógeno 1, 2 y 3 es decir, PAI-1 PAI-2 y PAI-3) y proteasa nexina (Potempa et al., 1994).

8. BHE y patologías del SNC

Como se ha mencionado previamente, la BHE juega un papel fundamental en la homeostasis cerebral. Así pues, su disfunción reviste una gran importancia en el desarrollo y progresión de diversas patologías del SNC. Se ha observado un aumento en la permeabilidad de la BHE en el infarto isquémico o en el trauma cerebral (Ilzecka, 1996; Morganti-Kossmann et al., 2002), lo que lleva a la aparición de edema cerebral y al agravamiento del daño neuronal. En la esclerosis múltiple, la disfunción de la BHE forma parte directamente de su patofisiología (Minagar y Alexander, 2003) y contribuye al desarrollo de la enfermedad. Cuando se desarrolla un glioblastoma, se produce un incremento en la angiogénesis y en la permeabilidad de la BHE, que aumenta la supervivencia del tumor e implica la formación de edema cerebral (Anderson, 2008). También se han observado alteraciones en la

BHE en enfermedades como Parkinson, Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o el complejo de demencia asociada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Zlokovic, 2008) Pero no sólo se observan alteraciones en las enfermedades neurodegenerativas, ya que también se observan disfunciones en la BHE en enfermedades tales como autismo, obesidad, epilepsia o esquizofrenia (Palmer, 2010).

Además de las patofisiologías que comprometen la integridad de la BHE, ésta representa todo un desafío para la industria farmacéutica en el contexto de las farmacoterapias útiles en patologías que afectan al cerebro. En las enfermedades del SNC, la BHE previene la entrada y acumulación del 98% de los medicamentos (Hawkins y Davis, 2005; Pardridge, 2003; Pardridge, 2005; Pardridge, 2006; Pardridge, 2010), puesto que además de su baja permeabilidad y su lipofilia, expresa diferentes transportadores que de una manera activa influyen en los niveles de los fármacos en el cerebro (Hermann et al., 2006; Löscher y Potschka, 2005b) La mayoría de los fármacos más prometedores no llegan a ser realmente efectivos porque no alcanzan una concentración suficiente en cerebro debido a la presencia de la BHE; característica que constituye el principal obstáculo en el desarrollo de terapias para las enfermedades del SNC, incluyendo enfermedades neurodegenerativas, cerebrovasculares o cáncer. Únicamente algunas moléculas lipófilas (con capacidad para formar menos de 8 enlaces por puentes de hidrógeno) y de un peso molecular muy pequeño (menos de 400-500 Da) son capaces de atravesar la BHE (Pardridge, 2006). Por tanto, para que se puedan abordar farmacoterapias más efectivas es de gran importancia entender tanto la patofisiología de la BHE como los procesos que regulan sus sistemas de transporte (Cecchelli et al., 2007; Kuhnline Sloan et al., 2012).

ETANOL

1. Aspectos generales y marco histórico

Con el término alcohol se define generalmente el alcohol etílico o etanol. La palabra alcohol proviene del árabe “*alkukhuḥ*” y significa “el espíritu”. El alcohol se presenta como un líquido claro, incoloro, volátil, inflamable, soluble en agua y lípidos (Deitrich et al., 1989) y miscible en cloroformo y éter. Se forma por fermentación del azúcar simple (en forma natural) o por destilación del mosto fermentado (en forma adquirida). El etanol constituye el principal componente psicoactivo de las bebidas alcohólicas y cuando se habla de graduación de una bebida se refiere al porcentaje de etanol contenido en la bebida. Respecto a su valor nutritivo, 1 gramo de alcohol aporta al organismo 7.1 kcal; sin embargo, este aporte energético no se acompaña de un aporte nutritivo, como minerales, proteínas o vitaminas. Desde un punto de vista sociocultural, el etanol es una de las drogas más antiguas y consumidas por todas las culturas tanto por su acción psicotrópica como por su aporte energético. Su uso se ha implicado en ambientes sociales, culturales, médicos y religiosos donde el alcohol siempre ha asumido significados simbólicos. Los primeros datos sobre consumo de alcohol, datan del Paleolítico donde fermentaban la miel, obteniendo un producto denominado, hidromiel. En el año 4000 antes de Cristo en Babilonia, se elaboraba el *Shiraku*, a base de cebada que era utilizada para alimentar a los enfermos y honrar a los dioses. Este tipo de cerveza se hizo muy popular entre los pueblos antiguos y no tardó mucho en traspasar los límites de la Antigua Mesopotamia, y de allí el maravilloso “elixir” llegó a Egipto. Los romanos difundieron el vino por toda Europa y fueron los árabes quienes descubrieron la destilación y la introdujeron en Europa. Durante la Edad Media se conocía con el nombre de “*aqua vitae*” ya que se asociaba a salud y bienestar. En la actualidad, dada su fácil disponibilidad y su precio accesible, se sigue consumiendo en la mayoría de países occidentales pero predomina más su uso asociado a la diversión. El

alcohol se consume sobre todo por sus efectos euforizantes, psicoactivos y desinhibitorios y se ha convertido, en la droga de abuso más consumida en las sociedades occidentales. En Estados Unidos el abuso y la dependencia de etanol afectan a aproximadamente 14 millones de personas, mayoritariamente hombres. En cuanto al consumo de alcohol entre los adolescentes y los jóvenes, la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) detecta una disminución en la edad de inicio en el consumo de alcohol produciéndose entre 12 y 13 años, existiendo un porcentaje de bebedores a la edad de 18 años casi comparable a la edad adulta. Algunas estimaciones apuntan que el alcohol causa el 6.8% de las enfermedades en Europa, siendo este el continente donde el consumo de alcohol es mayor. España es el tercer país productor de alcohol a nivel mundial, tras Francia e Italia y uno de los países donde el consumo de alcohol y los problemas que de él derivan tienen mayor importancia. Datos obtenidos de la última encuesta del Plan Nacional sobre Drogas (2011-2012) realizada a individuos de 15 a 64 años, ponen de manifiesto que el alcohol sigue siendo la sustancia psicoactiva con mayor consumo en la población española. De hecho, en el 2011 un 90.9 % de la población había probado alguna vez en su vida alguna bebida alcohólica, un 76.6 % en los últimos 12 meses, un 62.3 % en los últimos 30 días y un 10.2 % diariamente. Según la edad, la prevalencia de consumo en los últimos 12 meses es del 79.1 % entre los 15 y 34 años y va descendiendo ligeramente con la edad, con un 75.1 %, entre los 35-74 años. En 2012/2013 se ha hecho una encuesta estatal sobre uso de drogas en Estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14 a 18 años de toda España (ESTUDES) en 27.503 estudiantes de 747 centros educativos públicos y privados para conocer la situación y las tendencias de los consumos de drogas, los patrones de consumo, los factores asociados y las opiniones y actitudes. Este estudio ha revelado que la droga consumida por un mayor porcentaje de estudiantes de 14 a 18 años sigue siendo el alcohol seguido por tabaco y cannabis (figura 10).

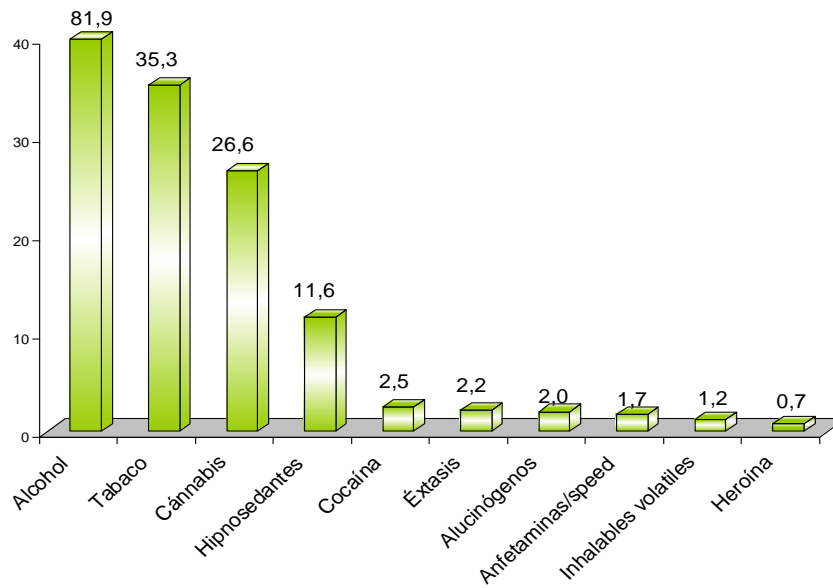


Figura 10: Porcentaje de consumidores de drogas en el último año. Fuente: ESTUDES (14-18 años), 2012/2013.

Este consumo se extiende más entre las mujeres (82.9% frente a 80.9% en hombres) y entre los 14 y 16 años el % de chicas que se emborracha es mayor que el de los chicos. Este patrón cambia después de los 17 años. La edad media de inicio en el consumo se sitúa entre los 13 y los 16 años y el porcentaje de consumidores de drogas aumenta con la edad pasando desde un 63.1% de consumidores con 14 años hasta un 91.3% de consumidores con 18 años. El 81,9% de los estudiantes declaran haber consumido etanol en el último año (2012) y el 74% en el último mes. Más de la mitad de los jóvenes de 16 años se ha emborrachado en el último año y el % de estudiantes que se emborrachan aumenta con la edad. La mitad de los jóvenes de 17 años ha hecho *binge* en el último mes. Son más habituales los consumos intensivos (borracheras) entre los que “hacen botellón” (figura 11) que entre los que no lo hacen. El 62% ha hecho botellón en el último año y esta práctica aumenta con la edad: 4 de cada 10 jóvenes (14 años) y 8 de cada 10 (18 años) han hecho botellón en el último año.



Figura 11: Jóvenes que consumen por la calle (botellón).

Se consideran bebedores de riesgo cuando se sobrepasa una cantidad de alcohol al día, que es de 50 ml, en el caso de los hombres y 30 ml, en el caso de las mujeres. También se considera bebedor de riesgo a aquella persona que consume gran cantidad de alcohol en una ocasión o en un periodo corto de tiempo. En menores, cualquier consumo de alcohol se considera de riesgo. Antiguamente el patrón de uso del alcohol se limitaba a la ingesta de pequeñas cantidades de vino en las comidas y únicamente por la población adulta. Sin embargo, los patrones de abuso han variado últimamente en España, ya que ahora existe un elevadísimo consumo en la juventud, sobre todo, durante el fin de semana. Consiste en un consumo muy elevado en un corto periodo de tiempo, dando lugar a un patrón de consumo denominado en inglés como “*binge drinking*” que se traduce al español como “consumo en atracón” o ‘consumo intensivo’. Se considera que el consumo de alcohol es problemático cuando el bebedor ha padecido o padece algún problema relacionado con el alcohol, como conducir bajo sus efectos o presentar problemas médicos, conductuales, familiares o psicológicos.

2. Estructura química del etanol

El etanol es un líquido volátil con un punto de ebullición a 78.34°C, solidifica a -114,1°C, su densidad a 20°C es 0,7893g/cm³, soluble en agua y extremadamente inflamable (arde con una llama azul). Es un alcohol primario debido a que el hidrógeno sustituido por el grupo hidroxilo pertenece a un carbono primario. Su fórmula es C₂H₆O y pertenece a la

serie de alcoholes alifáticos. Su estructura molecular y tridimensional se representa en la figura 12.

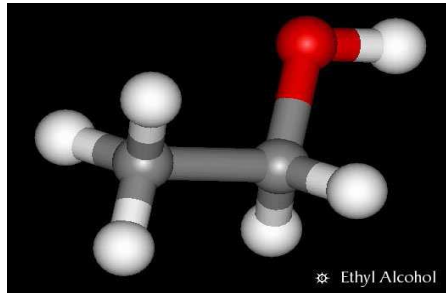
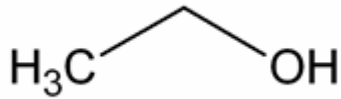


Figura 12. Estructura molecular y tridimensional del etanol.

Esta molécula presenta una gran polaridad debido a que posee un enlace O-H, de manera que el átomo de hidrógeno forma puentes con otros átomos de oxígeno de moléculas vecinas. Esto junto con su corta cadena de alcanos, hace que el etanol sea muy soluble en agua, siendo su hidrosolubilidad 30 veces mayor que su liposolubilidad.

3. Farmacocinética del etanol

3.1 Absorción

El alcohol por vía oral se absorbe mayoritariamente en el tramo proximal del intestino delgado (80%) y el resto en el estómago. La absorción total de alcohol es extremadamente rápida; comienza inmediatamente después de la ingesta y se completa en un tiempo que oscila entre 15 y 40 minutos. La velocidad de absorción se debe a que el alcohol etílico se propaga fácilmente a través de las membranas biológicas en cualquier punto del tracto digestivo, principalmente en el intestino delgado, pero también en la cavidad oral, estómago, colon y recto, lo cual determina la magnitud de sus concentraciones plasmáticas así como la intensidad y duración de sus efectos farmacológicos, siendo éstos de aparición más rápida en ayunas. Los alimentos retrasan la absorción, produciendo concentraciones mayores de etanol en sangre cuando se toma en ayunas. Se detecta en sangre a los 5 minutos de la ingesta y alcanza la concentración plasmática máxima entre 30 min. y 2h.

Existen otros factores que también afectan a la absorción de etanol, por ejemplo, el tiempo de vaciamiento gástrico, el grado de acidez del jugo gástrico, la ingesta simultánea de fármacos que alteran la motilidad gastrointestinal y el flujo sanguíneo de la mucosa.

3.2 Distribución

Se define distribución de una molécula como la liberación de una sustancia en los diferentes compartimentos del cuerpo. El etanol se distribuye rápidamente gracias a su pequeño tamaño y la completa solubilidad en agua de la molécula (hidrosolubilidad) y alcanza concentraciones hícticas similares a las plasmáticas. Cuanto mayor sea la vascularización de un determinado órgano, más intensos y rápidos serán los efectos inmediatos del alcohol: los primeros sistemas que se verán afectados por la difusión del alcohol son, por tanto, el SNC y poco después, el hígado, los riñones y el corazón. El etanol atraviesa las barreras hematoencefálica y placentaria y se excreta a través de la leche materna.

3.3 Metabolismo

Su degradación metabólica es esencialmente por oxidación hepática (90-98 %), por lo que el hígado es el órgano más expuesto a los efectos de los productos tóxicos que se desarrollan como resultado de la degradación de alcohol. Un 2-10 % se elimina por vías accesorias como riñón (orina) y pulmón (aire expirado), aunque también pueden detectarse pequeñas cantidades de etanol en el sudor, lágrimas, bilis, jugo gástrico y saliva (Ueno et al., 1990). Además, existe un metabolismo cerebral del etanol.

En un adulto sano, la velocidad de metabolización es de unos 120 mg/kg/hora, cuando esta cantidad se supera, el sistema se satura y el alcohol se acumula.

3.3.1 Metabolismo periférico del etanol

Este metabolismo se produce principalmente en el hígado, donde sufre dos procesos oxidativos: el primero tiene lugar en el citoplasma del hepatocito mediante la alcohol deshidrogenasa citosólica (ADH), donde el etanol se

convierte en acetaldehído (Petersen, 1983), y después, en las mitocondrias, por acción de la aldehído deshidrogenasa (ALDH; figura 13) se transforma en acetato (Lieber, 1977). En una menor proporción el etanol se metaboliza también por otras rutas, como el sistema de oxidación microsomal (MEOS), dependiente del citocromo P-450 isoenzima 2E1, y la vía de la catalasa (Lieber, 1977) cuya contribución al metabolismo del alcohol es mínima.

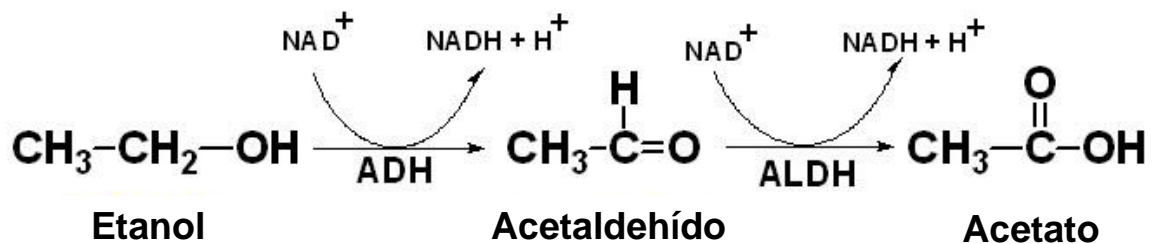


Figura 13. Metabolismo del etanol.

Se han encontrado varios polimorfismos genéticos de las enzimas ADH y ALDH, que son expresados de manera desigual en los diferentes grupos raciales. Así, algunos estudios han observado que un 40 % de los orientales poseen isoenzimas de ADH más funcionales, es decir, capaces de catabolizar el etanol más rápidamente, lo que lleva consigo una mayor acumulación de acetaldehído, que es un metabolito tóxico del etanol, produciéndoles efectos indeseables como cefaleas, enrojecimiento, náuseas y vómitos (Tanaka et al., 1997).

Por otra parte, algunos fármacos (disulfiram, cianamida) utilizados en el tratamiento del alcoholismo inhiben la actividad de la enzima ALDH, por tanto se produce una mayor acumulación de acetaldehído que es el responsable de los principales síntomas adversos del etanol.

3.3.2 Metabolismo central del etanol

Como ya ha sido mencionado anteriormente, existe un metabolismo cerebral del etanol, ya que existen en el SNC diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el alcohol. En 1968, Raskin y Sokoloff

demonstraron la existencia de actividad específica de ADH en cerebro (Raskin y Sokoloff, 1972). Se ha observado también que la isoforma más abundante de esta enzima es la ADH III (Rout, 1992), que presenta una afinidad muy baja por el etanol. En cerebro se ha descrito también la presencia de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS (sistema microsomal de oxidación del etanol). En concreto, el citocromo CYP450 2E1, isoenzima relacionada con el metabolismo del etanol, fue identificada en el cerebro por el grupo de Morgan (Morgan et al., 1992).

Varios estudios demuestran que el sistema de la catalasa se encuentra también en el SNC (Gill et al., 1992; Reddy et al., 1995) y se ha postulado un papel central para la catalasa en la oxidación del etanol en el cerebro. Así, Tampier y Mardones (1979) observaron que la adición de azida sódica (inhibidor de la catalasa) a un medio de homogenado de cerebro de rata, disminuye la oxidación del etanol a la mitad.

4. Efecto del etanol en SNC

La primera hipótesis sobre el mecanismo de acción del etanol se basa en la idea de que esta sustancia podría actuar a través de las membranas biológicas alterando de esta manera las propiedades físico-químicas de la célula, debido a su capacidad para disolverse en agua y su afinidad con un entorno lipídico. En los últimos años, la teoría lipídica de la acción del alcohol, ha cambiado para dar paso a nuevas hipótesis. La investigación en los últimos años ha identificado una serie de mediadores neuroquímicos que son particularmente sensibles a la acción del etanol, como diferentes sistemas de la neurotransmisión. Entre estos se incluye la adenosina (Anwer y Soliman, 1995; Concas et al., 1996; Deitrich et al., 1989), glicina (Aguayo et al., 1996; Mascia et al., 1996), acetilcolina (Coe et al., 1996; Freund y Palmer, 1996; Freund y Palmer, 1997; Madamba et al., 1995; Nagata et al., 1996), así como monoaminas y neuropéptidos (Kleven et al., 1995; Lau y Frye, 1996; Nagata et al., 1996; Oberheim et al., 2009; Wang et al., 1996). El etanol también ejerce importantes efectos en las membranas celulares, canales iónicos dependientes de voltaje y sistemas receptores acoplado a la

producción de segundos mensajeros (Kerschbaum y Hermann, 1997; Koob, 1996; Mihic y Harris, 1996; Solem et al., 1997).

4.1 Efecto en diferentes sistemas de neurotransmisión

Está ampliamente descrito que tanto la administración aguda como el consumo crónico de etanol dan lugar a procesos neurodegenerativos en regiones específicas del cerebro (Freund, 1973; Walker y Freund, 1971) afectando diferentes neurotransmisores. Existen evidencias contrastadas que implican al sistema dopaminérgico en algunos de los efectos centrales del etanol a nivel celular, molecular y comportamental. El sistema dopaminérgico ha sido estudiado como un posible mediador del refuerzo positivo del etanol (Di Chiara et al., 1971). Varios estudios han demostrado que el etanol produce una respuesta dopaminérgica bifásica, ya que dosis altas de etanol disminuyen la liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (Budygin et al., 2001; Imperato y Di Chiara, 1986) y por el contrario, la administración aguda de dosis bajas aumenta la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (ATV; (Gessa et al., 1985). Datos bibliográficos con estudios de microdiálisis demuestran que el sistema serotoninérgico, en concreto los receptores 5-HT₃, están implicados en el mecanismo por el cual el etanol aumenta la liberación de DA, ya que se ha observado que la administración de etanol junto con un agonista 5-HT₃ aumenta los niveles extracelulares de DA de manera más pronunciada que la administración de etanol únicamente (Campbell y McBride, 1995). Además, este efecto se previene con un antagonista del mismo receptor (Liu et al., 2006). Una disfunción serotoninérgica además de estar asociada a desordenes psiquiátricos, se ha asociado al mantenimiento del consumo excesivo de alcohol así como a la dependencia al alcohol (Kelaï et al., 2003). En cuanto a los niveles indólicos, existe cierta controversia acerca de si la administración de etanol produce cambios en los niveles cerebrales de 5-HT y su metabolito, el 5-HIAA. Bajaj (1983) demostró que la 5-HT estaba implicada en la regulación de la ingesta de comida y alcohol. El etanol también afecta al sistema opioide endógeno (Volpicelli et al., 1986) alterando la síntesis o la liberación de péptidos

opioides, activando así el mecanismo de refuerzo, o modificando la unión a los receptores opioides y alterando, por tanto, la señalización opioide. Se sabe que el sistema opioide participa en la adicción al alcohol, ya que interfiere en la transmisión dopaminérgica en el NAc (Olive et al., 2001) y la administración de antagonistas opioides disminuye la liberación de DA en el NAc inducida por etanol (Gonzales y Weiss, 1998).

Se ha demostrado también que el etanol aumenta la neurotransmisión GABAérgica a través de la potenciación de los receptores postsinápticos GABA_A, por mecanismos de fosforilación del receptor o por sistemas de fosforilación a través de segundos mensajeros (Chandler et al., 1998). Parece ser que los efectos iniciales estimulantes del etanol pueden deberse a la inhibición de la actividad GABAérgica, mientras que los efectos sedantes posteriores pueden estar mediados por la activación de este sistema (Reynolds et al., 1992). Tanto la administración aguda como crónica del etanol alteran la transmisión glutamatérgica. Los receptores glutamatérgicos se dividen en ionotrópicos, que forman un canal iónico y son el receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), los de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y los de kainato; y los metabotrópicos que están acoplados a proteínas G. La acción del etanol sobre los receptores AMPA y kainato requiere dosis más altas de las que se necesitan para inhibir los receptores de NMDA (Hoffman et al., 1989; Lovinger et al., 1989). Los antagonistas del receptor NMDA disminuyen el consumo de etanol (Wang y Woolverton, 2007). Entre los efectos del etanol diferentes evidencias sugieren que los cambios en la transmisión GABAérgica y glutamatérgica determinan la mayoría de los efectos agudos y a largo plazo del etanol (Chandler et al., 1998), entre ellos las alteraciones de las funciones cognitivas.

4.2 Etanol, funciones cognitivas y memoria

Entre los principales efectos adversos de etanol uno de los más importantes y estudiados es su acción sobre las funciones cognitivas a corto y a largo plazo. La intoxicación por alcohol se asocia con una disminución de la función cognitiva (Compo et al., 2011; Fillmore et al., 2007; Koelega, 1995;

Matthews y Silvers, 2004; Maylor y Rabbitt, 1993; Millar et al., 1992; Ogden y Moskowitz, 2004; Peterson et al., 1990; Schweizer y Vogel-Sprott, 2008) que está mediada por las regiones frontal y temporal del cerebro (Peterson et al., 1990; Weissenborn y Duka, 2003). Por ejemplo, el alcohol aumenta la impulsividad (de Wit, 2009), disminuye los procesos de atención (Dougherty et al., 2008) y produce déficit de memoria según la dosis (Davidson et al., 1997) (Naranjo y Bremner, 1993). La relación entre las concentraciones de alcohol en sangre y el deterioro cognitivo se define como dependiente de la dosis, en humanos (Bisby et al., 2010; Dry et al., 2012; Wester et al., 2010) y en modelos animales (Jedema et al., 2011; Ryabinin, 1998). Además, recientes estudios en humanos demuestran que el deterioro no es uniforme en los diferentes dominios del procesamiento cognitivo y que las dosis de etanol necesarias para afectar estos procesos pueden variar (Dry et al., 2012).

Se considera una intoxicación leve cuando los niveles de alcohol en la sangre alcanzan una concentración de 10-20 mM. Durante dicha intoxicación la mayoría de los individuos presentan incoordinación motora y una disminución en el tiempo de reacción. Cuando se alcanzan niveles plasmáticos superiores (20-40 mM, 100-200 mg/dl), se enlentece el pensamiento y el procesamiento cognitivo. Con niveles de 40 mM y superiores algunos individuos desarrollan ausencias de memoria (Nelson et al., 2003; White, 2003). Dichas alteración de memoria provocan en los individuos comportamientos complejos que no recuerdan posteriormente. Un apagón refleja un defecto grave en la formación de la nueva memoria y dicho estado puede tener consecuencias devastadoras. Junto con estos efectos agudos, el abuso crónico de alcohol se asocia con deficiencias persistentes en la memoria y en la cognición, es un estado que se denomina "demencia alcohólica" (Oslin y Cary, 2003). La comprensión de cómo el etanol produce sus efectos directos sobre la memoria y la cognición es importante en el desarrollo de prevenciones y estrategias de tratamiento para amortiguar el impacto en la salud pública del alcoholismo. Si bien, los mecanismos subyacentes de memoria no son completamente conocidos, distintas evidencias apoyan un papel importante en estos cambios de la neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato (Martin et al., 2000),

incluyendo LTP (potenciación duradera) y LTD (depresión duradera), candidatos principales en los mecanismos de la memoria sináptica (Malenka y Bear, 2004). Tanto los efectos adversos agudos como los crónicos están relacionados con aparición de disfunciones cognitivas y discapacidades en el aprendizaje. El efecto del etanol sobre la plasticidad sináptica relacionada con el aprendizaje implica múltiples neurotransmisores, receptores y sistemas de señalización intracelular (Lovinger y Roberto, 2013).

El hipocampo juega un papel clave en el aprendizaje y la memoria. En particular es importante en la formación de los recuerdos que incluyen componentes informativos temporales y de contexto que se reconocen como memoria episódica (Eichenbaum, 2004; SCOVILLE y MILNER, 1957). Las áreas principales del hipocampo son el giro dentado (GD), el área CA1 y el área CA3 (figura 13), regiones que proporcionan información en ambos sentidos desde el hipocampo a la corteza entorrinal.

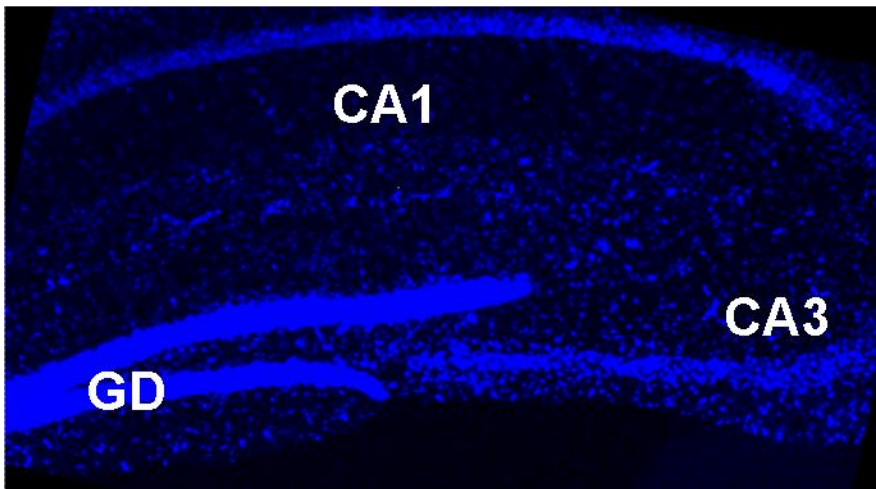


Figura 13: Representación de las tres áreas del hipocampo, giro dentado, CA1 y CA3.

El papel del hipocampo en los procesos mnésicos es juntar las representaciones semánticas almacenadas en la corteza, creando así un ambiente temporal y espacial para diferentes representaciones que se refieren a un evento particular. El sistema del hipocampo funciona a través de dos mecanismos que compiten entre sí, el patrón de separación y el patrón de asociación. El primero es el mecanismo utilizado para la codificación de nuevas informaciones. Sobre bases anatómicas y

estructurales se ha sugerido que el patrón de separación sería una función asociada con el giro dentado y que estaría facilitada por neuronas de CA1. Esto avala la hipótesis de que giro dentado y CA1 sean las zonas del hipocampo involucradas en la separación espacial y temporal (Kesner et al., 2000). El segundo mecanismo, el patrón de asociación es el mecanismo a través del cual, partiendo de pequeños fragmentos de recuerdos, reaparecen y se completan en la memoria representaciones de eventos y situaciones. En este mecanismo están implicados CA1 y CA3. Se ha demostrado que una red autoasociativa de CA3 sería fundamental en la formación de asociaciones arbitrarias, con activación inicial de CA3 seguida de la activación de CA1 (Rolls, 2006). Existe una competencia natural entre estos mecanismos. Cuando el cerebro recibe *input* externos este no entiende de manera inmediata si las informaciones son nuevas (patrón de separación) o si completan fragmentos de memoria ya existentes (patrón de asociación). El papel del hipocampo es precisamente optimizar esta ambigüedad creando cuantas más conexiones posibles para contextualizar lo mejor posible informaciones y episodios. Existe otra memoria importante, la memoria a corto plazo. Con pocas excepciones CA3 puede ser representada como una red de memoria de auto asociación que forma y almacena a corto plazo memorias episódicas (Kesner et al., 2000).

En resumen: CA3 está implicada principalmente en la memoria asociativa (Hunsaker y Kesner, 2008; Li y Chao, 2008) y juega un papel fundamental en la memoria a corto plazo y en la memoria que permite la asociación entre distintas características de un evento (ente objetos, sus posiciones y el contexto). CA1 y giro dentado están implicados en la memoria temporal y espacial. CA1 es importante en la asociación de eventos que se verifican con una diferencia temporal (Kesner et al., 2005; Lee et al., 2005) y para reconocer y colocar en orden temporal las informaciones espaciales (Gilbert et al., 2001; Kesner y Hopkins, 2001; Kesner y Rolls, 2001). Se ha demostrado que el hipocampo es crítico para recordar las secuencias específicas de eventos que son claramente no espaciales, como por ejemplo los olores (Agster et al., 2002; Fortin et al., 2002), y que también es fundamental para recordar lugares específicos que son claramente espaciales (Morris et al., 1982). La memoria espacial depende de la

integridad del hipocampo (Jarrard y Elmes, 1982) mientras que la memoria no espacial puede ser independiente del hipocampo en algunas tareas específicas que probablemente dependan de otras regiones del cerebro como los núcleos *caudado* y *putamen* (Nadel, 1991; Packard et al., 1989).

5. Etanol y adolescencia

La adolescencia es un periodo de desarrollo marcado por cambios en la fisiología, personalidad, emotividad y neurobiología que normalmente en los humanos se refiere a una edad entre los 12 y 20 años (Dahl, 2004). Cambios en la personalidad durante la adolescencia implican un aumento en la toma de riesgos (Spear, 2000), en la búsqueda de sensaciones (Steinberg, 2008) y en comportamientos imprudentes (Smith-Knapp et al., 1996) que incluye la experimentación con las drogas y con el alcohol. Los adolescentes experimentan un comportamiento de consumo de alcohol cíclico (*binge drinking*; 5 bebidas/episodio) con frecuencia más alta que los adultos (Gilder et al., 2011). El consumo de alcohol durante la adolescencia está muy difundido. De los adolescentes que reportan consumo episódico de alcohol durante las últimas dos semanas, el 8% han consumido bebidas de 8° (grados del número de volúmenes de alcohol contenidos en 100 volúmenes del producto, medidos a la temperatura de 20 °C), el 16% de 10° grados, y el 25% de 12°. Una mayor propensión al aumento de riesgos se observa también en ratones (Gerra et al., 2002) y en ratas adolescentes (Doremus et al., 2005; Walker et al., 2008) incluyendo entre estos el aumento del consumo de alcohol. Se ha demostrado que los ratones en edad adolescente se autoadministran mayores cantidades de etanol que a los adultos (Doremus et al., 2005; Walker et al., 2008) de tal manera que el consumo corresponde a dos o tres veces más en relación con el peso corporal (Lancaster et al., 1996).

Por otra parte, los adolescentes, en comparación con los sujetos de mayor edad, son más sensibles a los efectos del etanol (Varlinskaya et al., 2010). En la adolescencia, siendo, como se ha mencionado anteriormente, un período de desarrollo, se producen muchos cambios neurobiológicos que

hacen que la comprensión de los mecanismos implicados en el consumo de etanol sea más complicada. Estos cambios se producen en muchas regiones del cerebro entre las cuales se encuentra el hipocampo donde el etanol produce efectos importantes (Matthews y Silvers, 2004) como por ejemplo se ha observado que el consumo de alcohol en adolescentes reduce el volumen del hipocampo (De Bellis et al., 2000).

6. Modelo de *binge drinking*: *drinking in the dark*

Durante años el estudio de la neurobiología de alcoholismo se ha basado principalmente en diferentes modelos de consumo en roedores a los que se exponía 24h al día a soluciones de agua y etanol al mismo tiempo. Sin embargo, este modelo de consumo voluntario de etanol no es adecuado porque la mayoría de los roedores suelen consumir bajas cantidades de etanol que generan niveles de etanol en la sangre no significativos farmacológicamente. Por otra parte, el abuso de alcohol y el alcoholismo son, a nivel comportamental y biológico tan complejos, que ningún modelo animal único reúne todas las características de la condición humana (Crabbe et al., 2011; Rhodes et al., 2005). El Instituto Nacional sobre el Abuso de Alcohol y Alcoholismo (National Institute on Alcohol Abuse y Alcoholism, NIAAA) define el *binge drinking* como un patrón de consumo que produce unas concentraciones plasmáticas superiores a 0.08% (80mg/dl) (NIAAA, 2004). El patrón de consumo para producir estas concentraciones es de cuatro/cinco bebidas respectivamente en un hombre adulto y en una mujer adulta en un periodo breve de tiempo (2h). En el caso de los ratones, se considera *binge drinking* cuando se produce una concentración plasmática mínima de 100 mg/dl debido a la alta tasa de metabolismo del etanol en estos animales (Crabbe et al., 2011) .

En esta Tesis se utilizó un modelo de ratón de *binge drinking* descrito originariamente por el grupo de John Crabbe (Rhodes et al., 2005) denominado *Drinking in the Dark* (DID) o consumo de alcohol en la oscuridad.

Un estudio de Dole y Gentry (Dole y Gentry, 1984) reveló que los ratones beben más etanol en el periodo de oscuridad, periodo en el cual son más activos. Los mayores niveles de la ingesta de alimentos en ratones se producen durante las cuatro primeras horas desde que comienza el ciclo de oscuridad (Tabarin et al., 2007). En el protocolo DID se ha utilizado este dato para aumentar los niveles de ingesta de etanol (Middaugh et al., 2003; Ryabinin et al., 2003). El grupo de Rodas evaluó la repercusión de diversos factores sobre la cantidad de etanol consumida utilizando distintas variaciones del procedimiento DID. Las variaciones incluyeron, entre otras, la concentración de etanol, el periodo de tiempo en el ciclo de oscuridad en el cual se proporcionó el etanol, la cepa animal y el género (Rhodes et al., 2005).

Finalmente Rhodes (Rhodes et al., 2005) estableció el protocolo DID adecuado que proporcionaba una mayor concentración de etanol en sangre. Dicho protocolo establece el empleo de ratones C57BL/6J (cepa de ratón con predisposición al consumo de etanol) mantenidos en un ciclo invertido de 12h de luz y 12 de oscuridad y con acceso limitado al etanol durante 4 días consecutivos. Se proporcionó etanol al 20% de forma individual, por sustitución de la botella de agua, 3h después del comienzo del ciclo de oscuridad; el etanol se suministró durante 2h los primeros 3 días extendiendo este tiempo a 4h el cuarto día (Rhodes et al., 2005). Este protocolo se ha utilizado comúnmente en los experimentos que utilizan este modelo para investigar la neurobiología de etanol (Kaur et al., 2012; Lowery-Gionta et al., 2012; Lyons et al., 2008; Ryabinin et al., 2003; Sparrow et al., 2012).

Una de las ventajas del protocolo DID es que está aceptado en la literatura internacional como un modelo que simula el patrón de consumo excesivo de alcohol en humanos por el hecho que los ratones se autoadministran el compuesto. Con otros modelos de intoxicación, el etanol es administrado por el experimentador mediante inyecciones, por sonda nasogástrica o con la exposición a vapores de etanol (Bake et al., 2012; Becker y Lopez, 2004; Criado et al., 2011; Gilliam y Kotch, 1996; Pandey et al., 2008).

Otra ventaja es que, como se señaló anteriormente, los ratones muestran una concentración plasmática significativa gracias al ciclo invertido por eso

no se requiere la inclusión de compuestos dulces en la bebida para motivar un alto nivel en la ingesta de alcohol (Rhodes et al., 2007; Sharpe et al., 2005). Por otro lado, los animales no se ven obligados a consumir etanol mediante supresión de líquidos (agua) a largo plazo o mediante la inclusión del etanol en una dieta que es la única fuente de nutrientes (Cozzoli et al., 2009; Roy y Pandey, 2002; Szumlinski et al., 2005). Por esto su motivación para beber no es cuestionable.

El período de la adolescencia en el desarrollo del ratón es bastante corto, y se estima que transcurre entre los días 28 y 42 (Spear, 2000), de tal manera que el tiempo para que los animales se acostumbren al *binge drinking* con protocolos, que requieren largos plazos de habituación o formación, es reducido. El procedimiento DID, simple y con alto rendimiento tiene claras ventajas al permitir estudiar el consumo de etanol en ratones durante el periodo de la adolescencia. Por esto varios estudios ya se han aprovechado de esta ventaja. Por ejemplo, se demostró que los ratones adolescentes C57BL/6J muestran mayores niveles plasmáticos de etanol (consecuencia de un consumo mayor de alcohol) respecto ratones adultos y que este mayor consumo puede estar relacionado con una reducción de la sensibilidad a los efectos adversos de etanol (Holstein et al., 2011). Además, se ha demostrado que el consumo de alcohol en adolescencia en ratones C57BL/6J promueve el aumento de consumo del mismo en edad adulta (Moore et al., 2010).

Si bien hay claras ventajas en el procedimiento DID en comparación con otros modelos de consumo de etanol existen limitaciones que hay que considerar.

1. Como se señaló anteriormente en el procedimiento DID se sustituye el agua por el etanol en el momento del ciclo circadiano del animal asociado con altos niveles de ingesta. Claramente la administración del etanol en la oscuridad es un componente clave para el alto nivel de ingesta de etanol. De hecho se ha demostrado que cuando los ratones C57BL/6J tienen acceso al etanol 20% a partir de 3h siguientes al comienzo del ciclo de luz, estos consumen una cantidad muy inferior de etanol con concentraciones plasmáticas de 20 mg/dl (Lowery-Gionta et al., 2012). Sin embargo se ha reconocido en numerosas publicaciones que la actividad neurológica y en

los sistemas neuroquímicos en el SNC sufren cambios según las fluctuaciones circadianas que están implicados en comportamientos como el consumo de alcohol (Mitchell et al., 1998; Sprow y Thiele, 2012; Vidal y Lugo, 2006).

2. Otra limitación relacionada con el acceso al etanol durante la fase de oscuridad es el posible impacto del consumo sobre la ingesta de alimentos y la consecuente variación del peso corporal. Ya que hay una coincidencia entre el periodo en el cual se produce la intoxicación de etanol y el consumo de alimentos es posible que el protocolo DID pueda interferir con los patrones normales de alimentación, hecho que podría conducir a un déficit nutricional. Este problema puede ser más acuciante en los experimentos que implican el uso repetido del procedimiento DID durante días y semanas. Por lo tanto, es recomendable hacer un seguimiento de la alimentación y del peso corporal si se emplean procedimientos DID a largo plazo. Sin embargo, la restricción de alimentos a corto plazo no altera los niveles de consumo de etanol con este protocolo (Lyons et al., 2008).

3. El grupo de Rhodes (Rhodes et al., 2007) utilizó el protocolo DID con 12 cepas puras de ratones. De estas cepas, sólo en los ratones C57BL/6J se alcanzaron concentraciones plasmáticas superiores a 100 mg/dl. Por lo tanto, el empleo del protocolo DID es más adecuado en esta cepa de ratones. La importancia de la selección de la cepa de ratón debe también tenerse en cuenta al aplicar procedimientos de DID a animales transgénicos y modelos de ratones knockout. En muchos casos, la ingeniería genética crea subcepas de ratones que consumen moderadas cantidades de etanol (Belknap et al., 1993) y dejan de mostrar una suficiente ingesta de alcohol con el consiguiente efecto sobre las concentraciones plasmáticas (Rhodes et al., 2007). Esta potencial limitación puede ser superada intentando producir ratones con un fondo CB57BL/6 a través de múltiples generaciones para producir ratones que son en un casi 100% con un fondo genético CB57BL/6.

4. Los ratones CB57BL/6J podrían desarrollar una sensibilidad reducida a los componentes de sabor adverso del etanol y, por lo tanto, estar dispuestos a consumir más. Si bien este argumento no se puede descartar por completo, no hay evidencias que lo demuestren. En principio los

animales muestran la ingesta de etanol relativamente estable durante el procedimiento DID de 4 días (Rhodes et al., 2005). Pero si los ratones desarrollasen una sensibilidad reducida a los componentes adversos del etanol esto aumentaría gradualmente y sería probablemente más evidente con repetidos protocolo DID a lo largo de más semanas. Sin embargo se ha demostrado recientemente que los niveles de consumo de etanol no aumentaron, incluso después de 10 ciclos de DID (Cox et al., 2013).

5. Otra limitación es la imposibilidad de elección para una fuente alternativa de líquido en las horas donde los ratones tienen acceso exclusivamente a etanol. Esto aumenta la probabilidad de que los altos niveles de alcohol obtenidos deriven de que los ratones se ven obligados a elegir entre el consumo de alcohol y la sed que resulta de la supresión de líquidos. Sin embargo, se ha demostrado que los ratones no se ven obligados a beber etanol en este corto período de privación de agua (Crabbe et al., 2011), ya que pueden optar por no beber etanol como eligen muchos otras cepas de animales que beben muy poca solución de etanol en la prueba DID (Rhodes et al., 2007). Además el alto consumo de etanol con el protocolo DID no está causado por la sed derivada de la alimentación (Lyons et al., 2008). En conjunto, parecería poco probable que el alto consumo de etanol derivado del protocolo DID sea el resultado de la falta de una opción de fluido alternativo que impida la sed.

En el estudio de la neurobiología del etanol en *binge drinking* algunos investigadores han hipotetizado que este protocolo DID se podía utilizar en el estudio de la neurobiología de la transición desde el consumo de alcohol hasta la dependencia de alcohol (Thiele, 2012). La sorprendentes similitud entre los resultados obtenidos con los modelos de consumo de etanol *binge drinking* "no-dependientes" (Lowery-Gionta et al., 2012; Sparrow et al., 2012) y con modelos similares de ingesta de etanol "dependientes" (Gilpin et al., 2011; Roberto et al., 2010), con respecto a la neuroplasticidad y a los cambios en el sistema neuroquímico central, sugieren la posibilidad de que mediante el empleo de los episodios repetidos del modelo DID, podría ser posible estudiar la neurobiología subyacente de la transición desde un modelo de consumo no dependiente a un modelo de consumo dependiente.

Respecto a este tema, un estudio reciente de ciclos repetidos de DID, demuestra como aumenta el consumo voluntario de etanol a medida que pasa el tiempo (Cox et al., 2013). En resumen, el procedimiento de DID es un modelo animal de *binge drinking* que promueve el consumo de altos niveles de etanol con consecuentes niveles plasmáticos farmacológicamente relevantes en cepas de ratón preferentes a etanol. En este protocolo de acceso limitado se aprovecha el período de oscuridad del ciclo del animal en el que las conductas de ingesta son elevadas. Sin embargo, el alto consumo de etanol no parece ser consecuencia de la necesidad de calorías y los ratones pueden consumir alcohol por vía oral por un tiempo sin sufrir efectos estresantes y potencialmente dolorosos asociados a los modelos de intoxicación que requieren la administración forzada del etanol por un experimentador. Por tanto se puede concluir que el protocolo DID comparte una alta similitud con el modelo de ingesta de alcohol en adolescentes siendo una herramienta ideal para el estudio de la neurobiología y la genética del *binge drinking*.

7. Etanol y neuroinflamación

La inflamación inmediata producida en el cerebro por infección o daño cerebral es un mecanismo de defensa de las células inmunes para la eliminación de los cuerpos extraños desde el sitio de lesión del tejido, que se asocia con una activación de las células gliales así como por la presencia de infiltrados linfocitarios (Griffiths et al., 2007). En los microvasos cerebrales la lesión del tejido es causada por el daño oxidativo durante el estrés. Las células del cerebro son extremadamente susceptibles al daño oxidativo debido a que los niveles de antioxidantes endógenos y exógenos no son abundantes en el cerebro (Lakhan et al., 2009). Las células inmunes se agregan en el lumen del vaso donde se ha producido una lesión y aquí se convierten en células altamente activadas y comienzan a infiltrarse en el tejido cerebral. La infiltración crónica de las células inmunes en el cerebro como resultado de mediadores pro- y anti- inflamatorios junto con el daño oxidativo, conduce a la patología de la neuroinflamación. La inflamación

neurovascular está integrada por una activación compleja de células endoteliales cerebrales, microglia, astrocitos y neuronas. En este proceso inflamatorio las células neuronales son vulnerables y secretan agentes tóxicos como citoquinas y productos oxidativos. La oxidación mediada por neuroinflamación es una característica común en muchas enfermedades neurológicas tales como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y en esclerosis múltiple (Lin y Beal, 2006; Maracchioni et al., 2007) puede ser debida a una disfunción de la BHE (Daneman y Rescigno, 2009).

La neuroinflamación y neurodegeneración inducidas por el alcohol siguen un patrón parecido respecto a la lesión del tejido y a la respuesta inmune adaptativa. Hay crecientes evidencias de que el alcohol media la producción de citoquinas en todos los órganos importantes como pulmón, hígado, intestino y cerebro causando daño al tejido respectivo (Crews, 2006; McClain et al., 2004). El equipo de Fulton Crews (Crews et al., 2004) demostró que la secreción de mediadores pro-inflamatorios (TNF α , LPS y MCP-1), debido a la ingesta crónica de alcohol, conduce a neuroinflamación y degeneración neuronal (Qin et al., 2008; Vallés et al., 2004). Es interesante observar que las neuroadaptaciones y la respuesta neuroprotectora en los pacientes alcohólicos crónicos parecen estar relacionadas con la desregulación del sistema NF- κ B, factor de transcripción que en un primer lugar aumenta para después disminuir tras el aumento de sus inhibidores, como por ejemplo el homodimero p-50, y que este efecto pueda ser un mecanismo de compensación que permitiría una tolerancia mejor a la estimulación excesiva con etanol (Johansson et al., 2007; Yakovleva et al., 2011). Actualmente se acepta que los microvasos cerebrales son vulnerables al daño neuronal y a la neuroinflamación inducida a través del metabolismo del alcohol (Haorah et al., 2005a; Haorah et al., 2007; Haorah et al., 2005b). Se ha demostrado que las enzimas que metabolizan el etanol como la alcohol deshidrogenasa, el citocromo P450 2E1 y la catalasa se localizan en el endotelio microvascular del cerebro (Haorah et al., 2005b; Martínez et al., 2001; Zimatkin y Buben, 2006; Zimatkin et al., 2006). Inicialmente, el metabolismo del alcohol en el endotelio cerebral genera productos oxidativos y nitrosativos que causan daño oxidativo en la BHE y las células neuronales (Haorah et al., 2005a;

Haorah et al., 2005b; Haorah et al., 2008a; Haorah et al., 2008b). La alteración oxidativa de la BHE aumenta su permeabilidad para los agentes tóxicos y la migración de las células inmunes a través de la BHE (Haorah et al., 2007; Haorah et al., 2008b). La singularidad del daño oxidativo inducido por el alcohol es que se produce en todos los tipos de células neurovasculares porque cada tipo de célula es capaz de generar radicales libres a través del metabolismo del etanol (Floreani et al., 2010; Haorah et al., 2007; Haorah et al., 2008a). Un estudio reciente del 2011 ha descrito como los sitios donde hay un daño oxidativo de la BHE son también sitios donde se encuentran agregaciones de células inmunes en los microvasos, lo que abre el camino para la posterior aparición de la inflamación (Alikunju et al., 2011). En la regulación de todos estos procesos participan distintos tipos de células del SNC según las distintas funciones de cada tipo celular (figura 14).

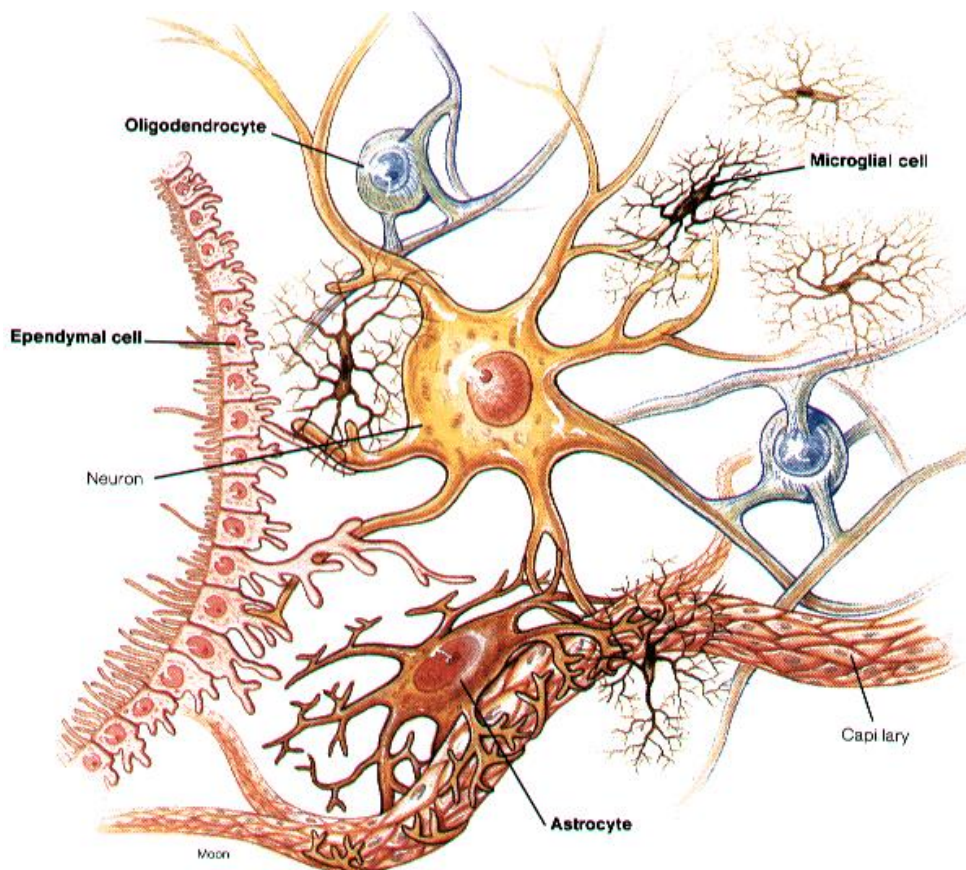


Figura 14: Representación de las múltiples interconexiones que se producen entre los distintos tipos celulares del SNC.

El alcohol aumenta la neuroinflamación y altera la respuesta inmune en un modelo animal de virus de la inmunodeficiencia humana-1 (Potula et al., 2006). La producción de citoquinas se inicia por la señalización a través del receptor de tipo Toll4 (TLR4) en respuesta a sus ligandos, bajo condiciones de estrés y de diversas patologías. El TLR4 se activa estimulando las vías de señalización que incluyen IRAK/MAPK/NF-KB y AP-1. Se ha demostrado también que la producción del estrés oxidativo inducida por el etanol desencadena la fosforilación de la proteína tirosina quinasa SRC y del TLR4 en astrocitos (Floreani et al., 2010).

7.1 Etanol y receptores *toll-like* 4 (TLR4)

El receptor *Toll-like* 4 pertenece a la familia *Toll-like* (TLR), familia de receptores expresados en distintos tipos celulares. Los TLR forman parte de los receptores que reconocen patrones moleculares (PRR, Pattern Recognition Receptores), un tipo de receptores que pueden reconocer ciertas estructuras típicas de los patógenos, y por ello implicados en la defensa del organismo y, en particular, en la inmunidad innata.

Los TLR se describieron por primera vez en 1988 por Hashimoto quien identificó una proteína transmembrana implicada en la determinación de la polaridad dorso-ventral en larvas jóvenes de *Drosophila melanogaster* (Hashimoto et al., 1988; Stein et al., 1991). Posteriormente, también se le atribuyó un papel crucial en la resistencia a las infecciones por hongos en la mosca adulta, junto con otros péptidos antimicrobianos. La secuenciación del genoma de *Drosophila melanogaster* nos ha permitido revelar la existencia de nueve proteínas que pertenecen todas a la misma familia Toll (Tauszig et al., 2000). En los años noventa se identificó la primera proteína de mamífero estructuralmente relacionada con *Drosophila* que actualmente se denomina receptor "*Toll-like*" 1 y 4 (Medzhitov et al., 1997; Nomura et al., 1994). Los TLR descritos hasta el momento (trece) son diferentes en humanos y ratones. Los TLRs 1-9 se conservan en ambas especies mientras que el TLR10 en ratón no es funcional, los genes 11-13 se han perdido en el genoma humano durante la evolución (Kawai y Akira, 2010).

Los TLRs se expresan en diferentes tipos celulares tales como células B, mastocitos (Iwamura y Nakayama, 2008), células NK, células T reguladoras (Sutmuller et al., 2007), macrófagos, monocitos, células dendríticas (Kaisho y Akira, 2006), neutrófilos (Sabroe y Whyte, 2007), basófilos (Yoshimoto y Nakanishi, 2006), así como las células no inmunes como las células epiteliales (Yoshimoto y Nakanishi, 2006) y las células endoteliales (Gibson et al., 2008). Además, los TLRs están presentes en el cerebro donde, hasta hace poco, se creía que su expresión estaba limitada a las células gliales, microglia (Olson y Miller, 2004), astrocitos (Bowman et al., 2003), y oligodendrocitos. Durante los últimos años, se ha incrementado la evidencia de la expresión de TLRs en las neuronas, lo que sugiere un papel importante de la familia de estos receptores en las neuronas tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas. Sin embargo, estudios recientes sugieren que las neuronas expresan algunos TLRs (Tang et al., 2007) como el TLR2 y el TLR4. Un estudio del laboratorio de Tang ha descrito la presencia de mRNA de TLRs 1-9 y los niveles proteicos de TLR 2,3 y 4 en cultivos neuronales primarios de rata (Tang et al., 2007). Además se ha observado la expresión de mRNA de los TLR 1-8 en neuronas *in vivo* (Mishra et al., 2006). El papel atribuido clásicamente a los TLRs ha sido su contribución a los trastornos relacionados con la inmunidad. En cambio, evidencias recientes sugieren que dichos receptores desempeñan un papel importante en facilitar las condiciones neurodegenerativas. Otra característica señalada recientemente es el papel de estos receptores en el desarrollo; publicaciones recientes indican que los TLR ubicados en el SNC están involucrados en el desarrollo y en la neuroplasticidad en adultos incluso en ausencia de activación por agentes infectivos o de daños en los tejidos (Okun et al., 2011).

Trabajos recientes muestran la diferencia entre los efectos producidos por la activación de TLR en neuronas diferenciadas o en células progenitoras neuronales, así como se describen los efectos de TLR2 y TLR4 sobre la diferenciación neuronal. La presencia de estos receptores en neuronas se ha comprobado en distintas regiones del cerebro como el hipocampo donde se ha observado que la estimulación directa de TLR4 por su ligando exógeno, el lipopolisacárido (LPS, componente principal de la membrana

Akira, 2007). La dos vías causan la inducción transcripcional de un conjunto de genes comunes (NF- κ B, AP-1 o IRFs) e inducen la secreción de proteínas proinflamatorias, como citoquinas (McCoy y Tansey, 2008; Takeda y Akira, 2004), proteasas y enzimas metabólicas.

Cuando la activación de la vía es dependiente de MyD88, esta proteína se recluta y asocia con los TLRs a través de los dominios TIR, mencionados anteriormente. Este evento permite que MyD88 active IRAK-4 (cinasa 4 asociada al receptor de IL-1), el cual fosforila IRAK-1 y se une a la proteína TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF). Este complejo se disocia e interactúa con un grupo proteico (TAK1, cinasa activada de TGF y TAB1 y 2, proteínas de unión a TAK1), a partir del cual surgen dos vías independientes de señalización: una que lleva a la activación de las MAPK (proteínas kinasas activadas por mitógenos; (Barton y Medzhitov, 2003) y otra que conduce a la activación del factor nuclear kappa B (NF κ B). La primera vía induce la fosforilación de las MAPK (ERK, JNK y p38) y promueve la translocación al núcleo del factor AP-1 (proteína activadora-1; (Kawai y Akira, 2006). AP-1 es una familia de factores de transcripción implicados en la proliferación y en la supervivencia celular, en la apoptosis y en la oncogénesis. Esta familia está compuesta de homodímeros y heterodímeros de fos (c-fos, fosB, Fra-1 y Fra-2), Jun (c-jun, junB y junD) y proteínas ATF (factor de activación de la transcripción, ATFa, ATF2, ATF3, ATF4 y B-ATF; (Karin et al., 1997). El prototipo AP-1 es un heterodimero c-jun/c-fos, que, como se ha mencionado, son proteínas reguladas por las vías de MAPK (Hess et al., 2004). C-fos y c-Jun dimerizan y se unen a sus secuencias diana de ADN en el núcleo. Dichas proteínas necesitan ser fosforiladas para ser activadas, modificación realizada por las MAPK (Eferl y Wagner, 2003). La segunda vía induce la translocación del complejo NF κ B (implicado en la regulación de un gran número de genes involucrados en la respuesta inmune) al núcleo donde se une a sus elementos de respuesta en los promotores de algunos genes (Foster y Medzhitov, 2009) como el gen de las citoquinas como TNF α . La dos vías inducen la producción de la citoquina TNF α (Shanley et al., 2001). La función principal del TNF α es la regulación de las células inmunes así como su implicación en otros procesos celulares tales como la muerte apoptótica, la diferenciación, la

proliferación, carcinogénesis y replicación viral. Por lo tanto, la activación de la vía MyD88-dependiente conlleva la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 y consecuente activación de TNF α .

A diferencia de lo descrito anteriormente en células del sistema nervioso como glia y células dendríticas, los resultados de la señalización activada por TLR4 en las neuronas son en gran parte desconocidos (figura 16). Las neuronas expresan una variedad inusual de complejos del TLR4 con las proteínas mieloides de diferenciación (MD-1 y MD-2) y con el cúmulo de diferenciación 14 (CD-14). Es posible que esta combinación de proteínas en el TLR4 sea responsable de la señalización no canónica mediada por TLR4 en las neuronas donde la señal parece no producir la translocación al núcleo mediante el factor nuclear NF κ B, ni transcribir el interferon- β (IFN- β), ni activar las quinasas c-Jun N-terminal (JNK; (Tang et al., 2007). Esto sugiere que ninguna de las vías de señalización tales como las que utilizan MyD88 y TRIF son el resultado de la activación de TLR4 en neuronas.

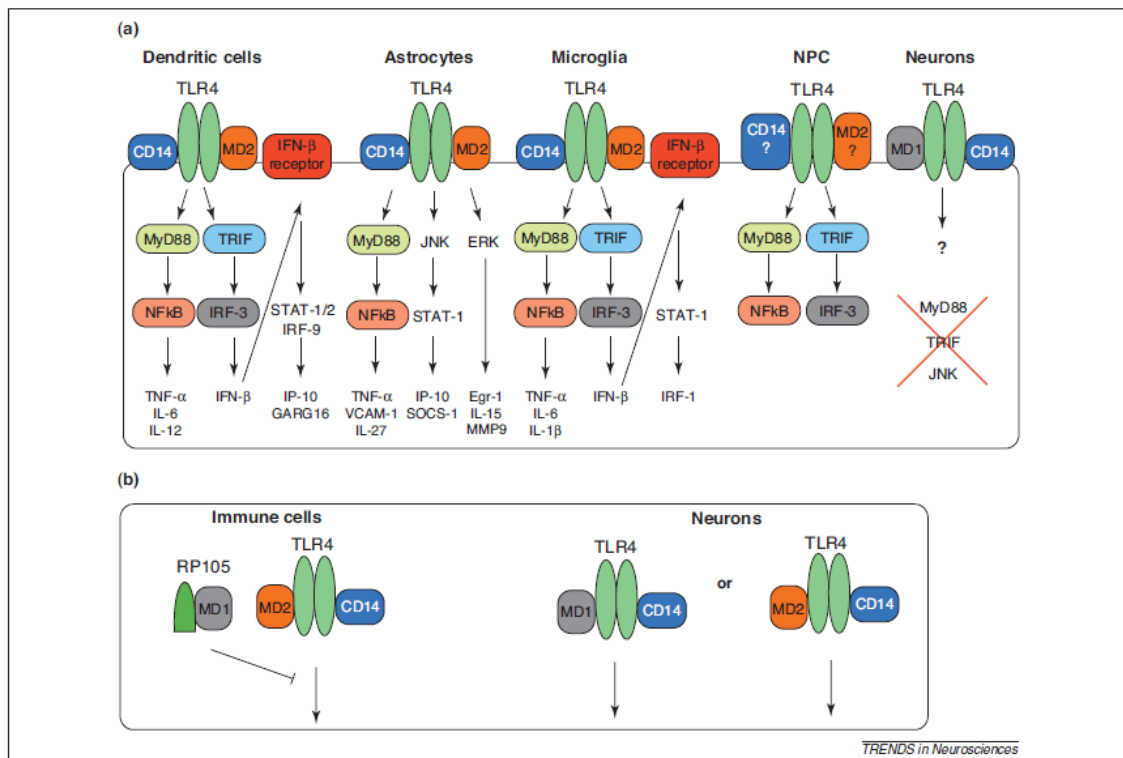


Figura 16: Señalización TLR4 en células dendríticas e en células neuronales (Okun et al., 2011).

Estudios recientes han demostrado que la neuroinflamación y la activación de los TLR expresados en el SNC participan en procesos neuropatológicos y neurodegenerativos (Chen et al., 2007) ya que una constante activación de la inmunidad innata puede promover procesos implicados en neurodegeneración (Marra et al., 2004). Además se ha demostrado que en ratones TLR4-KO, donde está suprimido el receptor se previenen isquemia y daño cerebral (Cao et al., 2007). Los procesos neuropatológicos a través de los cuales el etanol induce daños cerebrales no están claros; pero se ha demostrado un papel clave del TLR4. La administración crónica en ratas activa vías de señalización asociadas a activación del TLR4 y en cultivos induce muerte neuronal (Vallés et al., 2004). Se ha demostrado además que el etanol, en ausencia de otros ligandos como IL-6 o LPS, es capaz de activar en ratones los TLR4 con su vía de señalización en astrocitos (Blanco et al., 2005; Blanco et al., 2008), microglia y macrófagos (Fernandez-Lizarbe et al., 2008). Alfonso-Loeches et al demostraron el papel central del TLR4 en la neuroinflamación inducida por el alcohol y la degeneración neuronal con el uso de ratones *Knockout* para el gen TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010) y en una revisión del 2010 se describió el mecanismo por el cual mediante estimulación de los TLR se conecta el estrés oxidativo con la inflamación (Gill et al., 2010). Estos resultados sugirieron que los daños inducidos por el etanol pueden estar mediados por procesos de neuroinflamación y que la activación del TLR4 podría ser importante en este mecanismo (Blanco y Guerri, 2007).

8. Proteína del grupo de alta movilidad box1 (high mobility group box 1, HMGB1)

Como se ha explicado en el aparato anterior el TLR4 es un receptor transmembrana, cuyo ligando específico es la endotoxina bacteriana LPS. Recientemente se ha sugerido que es capaz de reconocer otros ligandos endógenos como el fibrinógeno, ácido hialurónico, fibronectinas o proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70; (Rifkin et al., 2005). La proteína del Grupo de Alta Movilidad Box1 (high mobility group box 1, HMGB1) es uno

de dichos ligandos endógenos. El HMGB1, llamada también Anfoterina, se describió primero como una proteína nuclear de unión al ADN y últimamente también se ha apuntado su participación en la señalización extracelular mediante la interacción con diferentes receptores como los TLR2 y TLR4 (Park et al., 2006; Park et al., 2004; Rauvala y Rouhiainen, 2010; Volz et al., 2010; Yang et al., 2010).

El HMGB1 es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 30kDa y está presente en el núcleo y en el citoplasma de células de mamífero. Ha sido considerada durante mucho tiempo un regulador clave de la formación del nucleosoma y de la transcripción génica (Allain et al., 1999; Ellwood et al., 2000; Park et al., 2006; Stros et al., 2002; Verrijdt et al., 2002). La liberación excesiva de HMGB1 se ha asociado a daño tisular agudo y crónico (Bianchi y Manfredi, 2007). La concentración de HMGB1 aumenta en muchas enfermedades como cáncer, enfermedad de Alzheimer, epilepsia del lóbulo temporal (ELT; Butler y Zeman, 2008; Giovagnoli y Avanzini, 1999), lesión pulmonar aguda, enfermedad de Parkinson (Kehagia et al., 2010), artritis reumatoide, lesiones cerebrales traumáticas; fundamentalmente los niveles de HMGB aumentan en dichas condiciones en áreas del cerebro relevantes en la patología (Kobori et al., 2002; Lindersson et al., 2004; Maroso et al., 2010; Yang et al., 2010). Por lo tanto, el incremento de HMGB1 puede tener importantes implicaciones clínicas.

Además de su liberación en respuesta al daño y a la inflamación (Maroso et al., 2010; O'Connor et al., 2003; Qiu et al., 2014; Scaffidi et al., 2002) recientemente, el hecho de que es capaz de aumentar la actividad de los estímulos proinflamatorios, tales como IL - 1 y LPS (Hreggvidsdottir et al., 2009; Sha et al., 2008), ha hecho que sea considerada como una citoquina pro inflamatoria (Lotze y Tracey, 2005; O'Connor et al., 2003; Qiu et al., 2008) con efecto similar, en el SNC, a las citoquinas TNF- α e IL-6. En concordancia con estos datos la proteína HMGB1 atenúa el LTP del hipocampo y, de acuerdo con su capacidad de activar TLR4, conduce a la fosforilación de las MAPK (He et al., 2013). Estos datos sugieren que los aumentos combinados en la expresión de HMGB1 y TLR4 en el hipocampo y su asociación, pueden ser responsables de la disminución en la plasticidad sináptica. Alteraciones del LTP y la memoria en ratones se

atribuyeron a la activación del TLR4 mediante la estimulación por HMGB1 (Costello et al., 2011). Por lo tanto, es concebible que una de las consecuencias del aumento de los niveles de HMGB1 puede ser el deterioro de aprendizaje y memoria, y que dicho deterioro este mediado por TLR4.

La secreción de HMGB1 se puede producir de forma pasiva por células que han sufrido algún daño o de forma activa por las células sometidas a condiciones de estrés (Bonaldi et al., 2003; Gauley y Pisetsky, 2009; Scaffidi et al., 2002; Youn y Shin, 2006). Los tipos celulares que liberan HMGB1 son tanto neuronas como células gliales (Bonaldi et al., 2003; O'Connor et al., 2003; Qiu et al., 2008; Scaffidi et al., 2002) pero la fuente celular del aumento de la HMGB1 en el hipocampo de ratones queda por determinar.

El alto contenido de lisina en la secuencia de Anfoterina (20% de los residuos aminoacídicos) sugiere que la proteína podría ser sensible a la plasmina, serina proteasa específica de lisina presente como zimógeno inactivo (plasminógeno) en el plasma y en el líquido extracelular y ceforraquídeo. La plasmina interactúa con sus receptores que se encuentran en la superficie de la mayoría de tipos celulares en alta densidad como por ejemplo en las células endoteliales. Uno de estos receptores descritos es el HMGB1 (Parkkinen y Rauvala, 1991). Además se ha demostrado que el activador del plasminógeno tisular (t-PA), que cataliza la formación de plasmina a partir del plasminógeno, se encuentra en los mismos lugares donde se encuentra la Anfoterina como por ejemplo en los procesos celulares y en substrato adherido a las células neurales (Krystosek y Seeds, 1986).

9. ETANOL Y BHE

El abuso de dosis elevadas de alcohol está asociado con cambios en la estructura de las uniones estrechas (Haorah et al., 2005a; Haorah et al., 2005b) y en la permeabilidad de la BHE (Cornford et al., 1982). En modelos animales de administración crónica de etanol (hasta 30 días a través de administración intragástrica 8-11 g/kg/día), se ha demostrado que la droga puede contribuir a la aparición de enfermedades neurodegenerativas y

aumentar la permeabilidad de la BHE con evidentes daños estructurales que se manifiestan con aumento de la permeabilidad por ^{14}C -tirosina, ^{14}C -triptófano y ^{14}C -DOPA (Borisenko, 1990; Karwacka, 1980). Este efecto se ha demostrado también en estudios de administración forzada en perro (Gulati et al., 1985) con la utilización de distintas concentraciones de etanol (30-90% de alcohol) que producían intoxicación dosis-dependiente. Tras intoxicación con etanol a través de sonda intragástrica (etanol 25% cada 8 horas durante 4 días, concentraciones plasmáticas de 354 mg/dl) en hipocampo y corteza entorinal de rata (Marshall et al., 2013) no se observan cambios en la extravasación de IgG.

A pesar de la gravedad de los cambios en la permeabilidad de la BHE relacionados con la administración crónica de alcohol, los mecanismos subyacentes todavía no están claros.

Existen escasos estudios sobre el efecto agudo del etanol en la BHE. Una administración única de etanol 3 g/kg no produce ningún cambio en la extravasación de *evans blue* (Elmas et al., 2001). Por otro lado, la administración aguda de etanol junto con un barbitúrico induce daños estructurales en las células endoteliales de los capilares cerebrales de ratas (Stewart et al., 1988).

Los productos oxidativos y nitrosativos producidos en todos los tipos celulares (Floreani et al., 2010; Haorah et al., 2007; Haorah et al., 2008a) por el metabolismo del etanol, inducen en cultivos de bovino y en cultivos celulares de humanos (células endoteliales microvasculares del cerebro, en inglés *BMVEC*) fosforilación de las uniones estrechas (occludina y claudin-5) que provocaría la alteración y el aumento de la permeabilidad de la BHE (Haorah et al., 2005a; Haorah et al., 2005b; Haorah et al., 2008a; Saleena et al., 2001). La implicación de la alteración de la estructura de las proteínas de las uniones estrechas como occludina y ZO1 en los efectos mediados por etanol se ha demostrado en otros estudios en cultivos humanos donde se observa como el aumento de acetaldehído induce destrucción de las uniones estrechas con un consecuente aumento de permeabilidad de la BHE (Atkinson y Rao, 2001) y de ratas (Bell et al., 2010).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El modelo animal de *binge drinking* llamado DID es un procedimiento que promueve altos niveles de consumo de alcohol con concentraciones plasmáticas farmacológicamente relevantes, mayores de 100 mg/dl (Rhodes et al., 2005). La variación más común del procedimiento DID utiliza ratones C57BL/6J alojados individualmente e implica la sustitución de la botella de agua por una botella que contiene etanol al 20 % durante 2-4 horas, comenzando 3 h tras el inicio del ciclo de oscuridad (momento del ciclo en el cual las conductas de ingesta son más elevadas). Este protocolo no requiere entrenamiento de los animales ni compuestos dulces para motivar el consumo y no los somete al estrés y al posible dolor de una administración por parte del experimentador. Estas características y el grado de consumo que se alcanza en el procedimiento DID permiten que este modelo simule el consumo de etanol por parte de adultos jóvenes (*binge drinking*). Aunque no existen datos sobre el efecto que produce el consumo de etanol en el paradigma DID sobre la permeabilidad de la BHE, se ha demostrado que el consumo crónico de etanol produce cambios estructurales en la BHE aumentando su permeabilidad (Borisenko, 1990; Karwacka, 1980). Este efecto se ha observado en estudios animales en los que se realiza la administración forzada de dosis elevadas de etanol que inducen intoxicación (Gulati et al., 1985) de etanol. El abuso de etanol induce cambios en factores clave que controlan la permeabilidad de la BHE como las enzimas MMPs (Abdul Muneer et al., 2012) que se ocupan principalmente de la remodelación de la matriz extracelular (Candelario-Jalil et al., 2009) la t-PA (Skrzypiec et al., 2009), la cuya actividad se modifica en cultivos tras exposición a etanol (Aikens et al., 1998; Tabengwa et al., 2002). Por otra parte, estudios de administración crónica han demostrado que el etanol induce activación microglial y astrogliar (Blanco y Guerri, 2007; Fernandez-Lizarbe et al., 2009; Fernández et al., 2013; Vallés et al., 2004) y muerte neuronal (Fernández et al., 2013; Vallés et al., 2004). En estos procesos desarrollan un papel fundamental los receptores *Toll-like* (TLR) y en particular el TLR4, tanto en microglia (Fernandez-Lizarbe et al., 2009) como en astrogliar (Alfonso-Loeches et al., 2010). El hipocampo juega un papel fundamental en funciones cognitivas y memoria, funciones afectadas por el consumo agudo y crónico de etanol (Oslin y Cary, 2003).

1. Hipótesis

El consumo intensivo y repetido de etanol utilizando el paradigma DID produce cambios en la matriz extracelular que comprometen la integridad de la BHE en hipocampo y que están causados por un incremento en la actividad de metaloproteinasas y t-PA. Las alteraciones en la permeabilidad de la BHE producidas por etanol son consecuencia de una estimulación del TLR4 y la consecuente activación de MAPK

2. Objetivos generales

1. Evaluar los cambios inducidos por el consumo de etanol en el paradigma DID sobre la integridad y la permeabilidad de la BHE e identificar los mecanismos implicados
2. Estudiar la respuesta glial y la muerte neuronal inducida por etanol utilizando el protocolo DID.
3. Evaluar los cambios inducidos por el consumo de etanol en el paradigma DID sobre la integridad y la permeabilidad de la BHE, sobre la respuesta glial y sobre la muerte neuronal en animales TLR4-KO.

3. Objetivos específicos:

Determinar el efecto del consumo de etanol en el paradigma DID sobre:

1. Extravasación de IgG al parénquima cerebral y expresión de dos proteínas de la lámina basal, laminina y colágeno IV.
2. Actividad enzimática de las gelatinasas MMP-9 y MMP-2.
3. Actividad enzimática de MMP-3.
4. Actividad enzimática y expresión de t-PA.
5. Activación microglial mediante el marcador Iba-1 y astrogliar mediante GFAP y S100B.
6. Muerte neuronal mediante el marcador Fluoro-Jade.
7. Expresión del TLR4 y de las proteínas implicadas en su señalización, HMGB1, MyD88, MAPK y AP-1.
8. Extravasación de IgG, expresión de las proteínas de la lámina basal, activación glial y muerte neuronal en ratones TLR4-KO.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

Para el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron: ratones macho C57BL/6J (figura 18) (*Harlan*, Barcelona) con un peso inicial comprendido entre 20 y 25 gramos de aproximadamente 6-7 semanas de edad, ratones *silvestres* (*Wild-type*, *WT*) de la cepa C57BL/6 (*Harlan Ibérica S.L.*, Barcelona) y ratones TLR4 *Knockout* (TLR4-KO) mutantes (con un fondo genético C57BL/6), procedentes originalmente del Dr. S. Akira (Universidad de Osaka, Suita-Japón) y cedidos por la Dra. Consuelo Guerri (Patología Celular, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia). Todos los animales se han mantenido, en grupos o aislados, en el animalario de la Universidad Complutense (Facultad de Medicina) con un ciclo de luz-oscuridad invertido de 12h, en condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (50-60%) y con disponibilidad *ad libitum* de agua y comida. En esta Tesis Doctoral cada procedimiento experimental se ha realizado de acuerdo a la normativa estipulada por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad Complutense y conforme a la Regulación Europea y Española, Directiva Europea 2010/63/CE, Real Decreto Español 53/2013 y ley 6/2013, del 11 de junio 2013 (B.O.E. nº140, 12 de Junio de 2013).

El manejo y el cuidado de los animales se han realizado con el objetivo de minimizar su sufrimiento y su malestar intentando reducir al máximo el número de ratones por grupo.



Figura 18: Ratón C57BL/6J

2. Modelo experimental: Consumo de etanol en la oscuridad (*Drinking in the Dark, DID*)

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el modelo de consumo de etanol en la oscuridad conocido en la literatura internacional como *Drinking in the Dark* (Crabbe et al., 2011; Sparta et al., 2008). Este paradigma está admitido como un modelo animal de consumo intensivo (*binge drinking*) de etanol que da lugar a concentraciones plasmáticas superiores a 100mg/dl. El modelo DID fue descrito originariamente por el grupo de Crabbe (Crabbe et al., 2005).

Previamente a la aplicación del protocolo DID, los animales se situaron en una habitación con ciclo invertido (9:00/21:00) durante 10 días. Se mantuvieron agrupados en grupos de 6 y tuvieron libre acceso a comida y agua. A continuación se colocaron en jaulas individuales de policarbamato específicas para ratón (tipo 22.2cm de longitud x 16.5cm de ancho x 14cm de alto, superficie del suelo 363cm², EH-II-1264, EHRET GmbH & Co. KG Labor- und Pharmatechnik, Alemania), igualmente teniendo libre acceso a comida y agua. Durante 7 días los ratones fueron habituados a beber agua de pipetas serológicas de plástico de 25ml graduadas a intervalos de 0.1ml y colocados siempre en el lado izquierdo de la jaula. A continuación los animales fueron expuestos a etanol durante el periodo de oscuridad. Tres horas después de apagar la luz, la pipeta de agua fue sustituida por una pipeta graduada que contenía etanol al 20%. Esta pipeta se mantuvo durante 2h los 3 primeros días y 4h el cuarto día. Algunos grupos de animales fueron sometidos únicamente a un ciclo de etanol y se sacrificaron el cuarto día inmediatamente después de las 4h de exposición a etanol o 24h más tarde (figura 19). En otros protocolos experimentales los animales se mantuvieron con agua los días 5, 6 y 7 tras la exposición a etanol y posteriormente se repitió el ciclo de consumo 3 veces consecutivas (figura 20). Igualmente se sacrificaron inmediatamente después de suprimir el consumo o 24h más tarde.

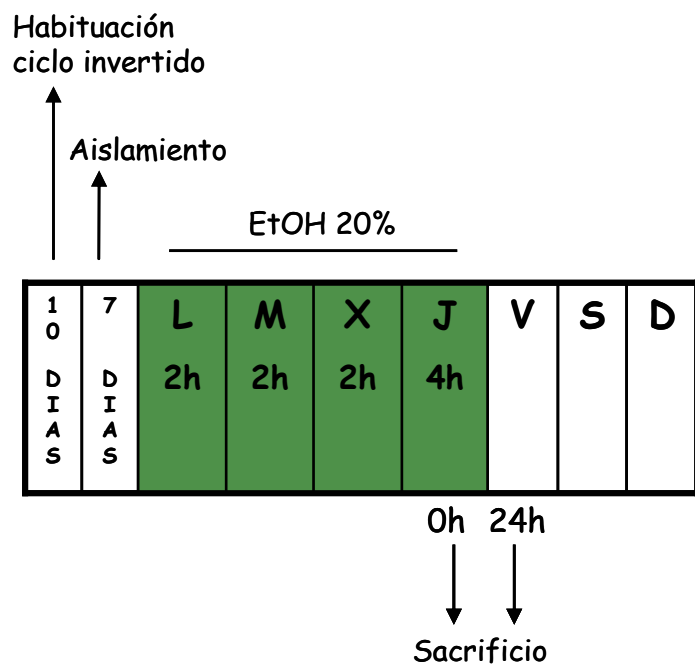


Figura 19: Representación del modelo *Drinking in the Dark* (1 ciclo de exposición a etanol).

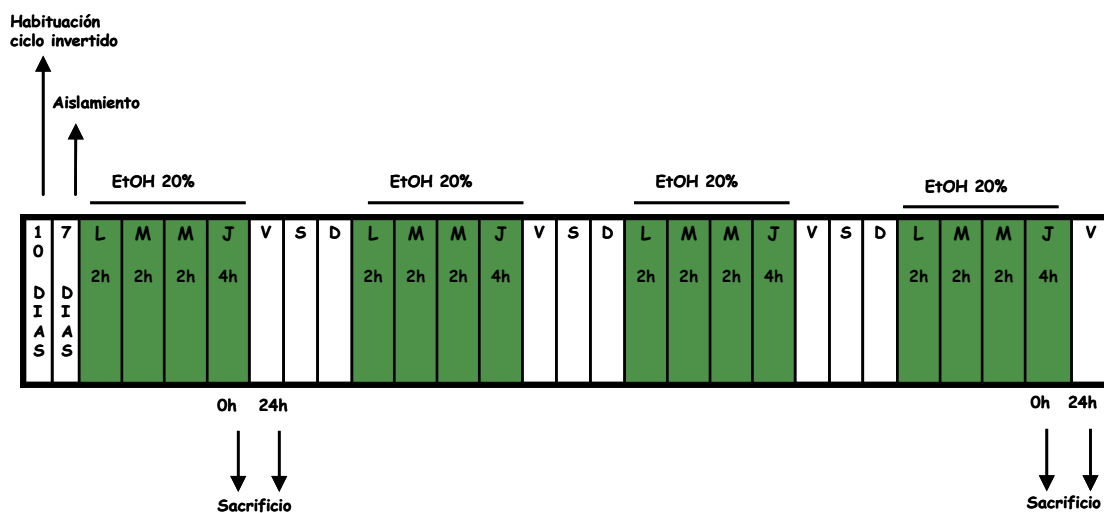


Figura 20: Representación del modelo *Drinking in the Dark* (4 ciclos de exposición a etanol).

Utilizando este procedimiento, los ratones C57BL/6J consumen suficiente etanol para lograr concentraciones plasmáticas de 80-100mg/dl (Lyons et al., 2008; Rhodes et al., 2005; Rhodes et al., 2007). Este protocolo de acceso limitado tiene la ventaja de que el momento del ciclo circadiano en el cual se exponen los animales a etanol coincide con el momento más activo de los animales; este hecho hace que la ingesta de etanol sea más elevada. El procedimiento DID provoca un consumo intensivo y no requiere una amplia formación ni la inclusión de compuestos dulces para obtener altos niveles de consumo de etanol.

Las soluciones de etanol se prepararon a partir de etanol anhidro absoluto (Ethanol absolute, Aditio, Panreac) el cual se diluyó al 20% de etanol (v /v) con agua corriente.

La construcción de los tubos de bebida se realizó siguiendo el método de Tordff & Bachmanov (2005) explicado con detalle en la página web www.monell.org/MMTPP (figura 21).

Los animales se pesaron todos los días a lo largo del protocolo experimental.



Figura 21: Representación de las pipetas.

Los grupos experimentales que se han empleado en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

Grupos experimentales:

1. Grupo control C57BL/6J
2. Grupo etanol C57BL/6J
3. Grupo control WT C57BL/6
4. Grupo etanol WT C57BL/6
5. Grupo control TLR4-KO C57BL/6
6. Grupo etanol TLR4-KO C57BL/6

Para cada grupo experimental se utilizaron diferentes técnicas según el tipo de tejido disponible (tabla 3).

Grupos experimentales	Exposición al protocolo DID	Sacrificio y obtención de tejido	Técnicas utilizadas
Ratones C57BL/6J controles y expuestos a etanol	- 1 y 4 ciclos sacrificando a los animales inmediatamente después de la retirada del etanol y a las 24h.	- Fijación del tejido cerebral mediante perfusión con paraformaldehído - Extracción del hipocampo (tejido fresco)	- Western blot: expresión de t-PA, TLR4, MyD88, MAPK, c-fos, HMGB1. - Zimografía en gel: activación enzimática de MMP-9, MMP-2, MMP-3, t-PA. - Inmunohistoquímica: extravasación de IgG, expresión de laminina, expresión de colágeno IV, expresión de GFAP, expresión de S100B, expresión de Iba-1 y fluorojade.
Ratones WT y TLR4-KO controles y expuestos a etanol	- 4 ciclos, sacrificando a los animales 24h después de la retirada de etanol	- Fijación del tejido cerebral mediante perfusión con paraformaldehído	- Inmunohistoquímica: extravasación de IgG, expresión de laminina, expresión de colágeno, expresión de GFAP, expresión de S100B, expresión de Iba-1 y fluorojade.

Tabla 3: Resumen de las técnicas utilizadas en cada grupo experimental:

3. Diseño experimental

Las distintas determinaciones se realizaron en el hipocampo de ratón debido a que es una estructura muy susceptible al daño neuronal producido por el consumo de etanol. Una consecuencia importante de la ingesta de etanol es el deterioro de la memoria y del aprendizaje dependientes del hipocampo (Cagetti et al., 2004; Lukoyanov et al., 2003) que se produce como consecuencia de la vulnerabilidad y de la neurodegeneración que induce el etanol en esta estructura cerebral.

3.1 Efecto del etanol sobre parámetros indicativos de alteraciones en la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE)

Los animales fueron sometidos a 1 o 4 ciclos de consumo de etanol y sacrificados inmediatamente después de la retirada del etanol o 24h más tarde. Se estudió el efecto del etanol sobre la actividad de MMP-2, MMP-9 y MMP-3 mediante zimografía en gel. Se evaluó la expresión de laminina y de colágeno IV y la extravasación de IgG mediante inmunofluorescencia en los diferentes subcampos del hipocampo: CA1, CA3 y giro dentado (GD). Como se ha explicado en la introducción, diferentes subregiones del hipocampo participan en distintos procesos mnemónicos: en la codificación de nuevas informaciones participan sobretudo el giro dentado (en la memoria espacial) y CA1 (en la memoria temporal; Kesner et al., 2000), en el patrón de asociación participan CA1 y sobretudo es importante CA3 (Rolls and Kesner, 2006) y en la memoria a corto plazo participa principalmente la CA3 (Kesner et al., 2000).

3.2 Efectos del etanol sobre parámetros indicativos de neuroinflamación.

3.2.1 Efectos del etanol sobre la activación glial

Los animales fueron sometidos a 1 o 4 ciclos de consumo de etanol y sacrificados inmediatamente después de la retirada del etanol o 24h más tarde.

Se estudió el efecto del etanol sobre la expresión microglial y astrogliar mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador Iba-1 para microglía activa y, GFAP y S100B para marcar poblaciones astrogliales en las diferentes zonas del hipocampo: giro dentado, CA1 y CA3.

3.2.2 Efectos del etanol sobre la expresión del receptor de tipo Toll 4 y mediadores de señalización intracelular de este receptor (MyD88, ERK, c-fos)

Los animales fueron sometidos a 4 ciclos de consumo de etanol y sacrificados inmediatamente después de la retirada del etanol o 24h más tarde. En estos experimentos y en los siguientes, se eligió el paradigma de 4 ciclos en base a que los resultados obtenidos en parámetros de BHE y en parámetros de activación glial, revelaron la existencia de efectos más pronunciados después de 4 ciclos de exposición a etanol e incluso de efectos que no se observaban tras 1 ciclo de consumo (ver resultados).

Mediante Western blot se estudió la expresión de TLR4 y de diferentes proteínas fundamentales para su señalización intracelular. Se analizaron: la proteína de diferenciación mielóide MyD88, la quinasa ERK1/2 (*extracellularly regulated kinase*), tanto la forma fosforilada como la proteína total, y la subunidad c-fos del factor de transcripción AP1 (activador proteína-1).

3.2.3 Efectos del etanol sobre la expresión de HMGB1

Los animales fueron sometidos a 4 ciclos de consumo de etanol y sacrificados inmediatamente después de la retirada del etanol o 24h más tarde.

La HMGB1 proteína (High Mobility Group Box 1) o anfoterina, es una proteína ligando de receptores de membrana como RAGE, TLR2 y TLR4. La unión de la proteína al receptor inicia una cascada de señalización intracelular que induce la actividad transcripcional de NF- κ B y la aparición de una respuesta inflamatoria. Se analizó la expresión de proteína HMGB1 mediante Western blot.

3.3 Efectos del etanol sobre la muerte neuronal

Los animales fueron sometidos a 4 ciclos de consumo de etanol y sacrificados inmediatamente después de la retirada del etanol o 24h más tarde.

Para evaluar el efecto del etanol sobre la muerte neuronal se ha utilizado un análisis histológico mediante tinción de fluorojade que es un derivado de fluoresceína aniónico que permite la tinción selectiva de los cuerpos celulares, los axones, y los terminales neuronales que sufren degeneración (Schmued et al., 1997; Schmued and Hopkins, 2000). Se han analizado las diferentes zonas del hipocampo: CA1, CA3 y giro dentado.

4. Descripción de las técnicas experimentales

4.1 Cuantificación de los niveles de etanol en plasma

Para determinar las concentraciones plasmáticas de etanol se recogieron muestras de sangre en jeringas heparinizadas del ventrículo izquierdo del corazón de los animales anestesiados durante el protocolo de perfusión.

Las muestras se centrifugaron en tubos Eppendorf heparinizados (un 10% del volumen total) durante 5 min., dos veces a 3500 rpm y se inyectaron en un analizador de etanol (AM1, Analox, U.K.) (Naassila et al., 2004). El fundamento de este método consiste en que el etanol se oxida por la enzima alcohol oxidasa en presencia de oxígeno molecular, por tanto el consumo de oxígeno es directamente proporcional a la concentración de alcohol. Los niveles de etanol en plasma fueron calculados como mg/dl utilizando un estándar de 100 mg/dl de etanol.

4.2 Determinación de expresión proteica

4.2.1 Extracción y homogenización de la muestra

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación inmediatamente después de haber retirado el etanol o a las 24h, tanto en los estudios de un ciclo como en los estudios de 4 ciclos de consumo.

Se extrajo el cerebro y se diseccionó sobre hielo picado para obtener el hipocampo. Las estructuras cerebrales extraídas se colocaron rápidamente

sobre hielo seco y se congelaron a -80°C hasta el día del ensayo. Las muestras se pesaron en una balanza de precisión (Electronic Balance BP61S, Sartorius, Alemania). El tejido fue homogenizado en 750 μl de tampón de lisis (Tris base 50mM, MgCl_2 2mM, NaCl 100mM, NP-40 1%, pH =7,4) conteniendo inhibidores de fosfatasa 1% y de proteasas 5% (Phosphatase/ Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, Madrid, España). El homogeneizado se pasó por una jeringa acoplada con una aguja de 27G para romper cualquier tejido residual no bien homogeneizado. A continuación se alicuotaron las muestras y se midió su concentración proteica por el método de DCTM Protein Assay. Se almacenaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

La medición de la concentración proteica de las muestras se realizó según las indicaciones del DCTM Protein Assay (Bio-Rad) empleando una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA; 0-1.5mg/ml). Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm (Lector de placas Elx 808, Bio-tek, Instruments, Inc., EE.UU.).

4.2.2 Western blot

La determinación de la expresión proteica se realizó mediante la técnica de Western blot. Para ello se hirvieron 15 μg de proteína en tampón de carga 4x (Tris-HCl 250mM pH 6,8, SDS 8%, glicerol 10%, DTT 2%, azul de bromofenol) 3:1 a 95°C durante 5 min. y se separaron mediante SDS-PAGE. Tras la electroforesis se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (tamaño de poro 0.45 μm , Hybond-P, GE Healthcare, España) en tampón de transferencia (25mM Tris-HCL, 192mM glicina, 20% metanol). Para minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, se incubaron las membranas en tampón TBS con 0.1% Tween 20 (TBST) y 5% de leche desnatada a temperatura ambiente durante un mínimo de 1h. Se añadieron después los correspondientes anticuerpos primarios (ver tabla 4) y se incubaron a 4°C en agitación durante toda la noche o, según la proteína, durante un mínimo de 2h. Posteriormente se realizaron 3 lavados en TBST para eliminar restos de anticuerpo y uniones inespecíficas. A continuación se incubaron las membranas con su correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (HRP:Horse radish peroxidase; ver tabla 5) durante 1h a temperatura ambiente. Tras la incubación con el anticuerpo

secundario se realizaron 3 lavados en TBST. Se confirmó la homogeneidad de proteína cargada mediante la expresión de β -actina proteína del citoesqueleto de las células reconocida como control de carga. La inmunoreactividad de las bandas se detectó mediante un sistema de quimioluminiscencia para Western blot (ECL Plus™ Western blotting detección kit, GE Healthcare, España) seguido de la exposición de las membranas en el Odyssey (Licor, Alemania). La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa ImageJ Software versión 1.42q (NIH, Maryland, EE.UU) y se refirió a la inmunoreactividad de la β -actina. Los niveles de proteína se calcularon respecto al porcentaje de la media de los animales control.

Anticuerpo anti-	Referencia	Huésped	Dilución	Casa Comercial	Peso Molecular
β -actina	A5441	Ratón	1:10000	Sigma (Barcelona, España)	45 kDa
Tubulina	T221	Conejo	1:10000	Sigma (Barcelona, España)	55 kDa
ERK	4695S	Conejo	1:10000	Cell Signaling (USA)	44 kDa
p-ERK	4370L	Conejo	1:1000	Cell Signaling (USA)	44 kDa
t-PA	SC15346	Conejo	1:1000	Santa Cruz (USA)	67 kDa
TLR4	SC16240	Cabra	1:50	Santa Cruz (USA)	95 kDa
MyD88	AB2064	Conejo	1:800	Abcam (UK)	30 kDa
c-fos	SC52	Conejo	1:500	Santa Cruz (USA)	30 kDa
HMGB1	AB18256	Conejo	1:800	Abcam (UK)	30 kDa

Tabla 4: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados para Western blot

Anticuerpo anti-	Referencia	Huésped	Dilución	Casa Comercial
Anti-mouse IgG HRP	NA931V	Oveja	1:5000	GE/Healthcare (Alemania)
Anti-rabbit IgG HRP	SC2305	Burro	1:5000	Santa Cruz (EE.UU)
Anti-goat IgG HRP	SC18351	Conejo	1:2000 1:5000	Sigma (Barcelona, España)

Tabla 5: Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados para Western blot

4.3 Actividad de metaloproteinasas

La determinación de la actividad de las metaloproteinasas se estudió en muestras de hipocampo mediante la homogenización manual en 750µl de tampón de lisis (Tris base 50mM, MgCl₂ 2mM, NaCl 100mM, NP-40 1%, pH=7.4, inhibidores de fosfatasa 1% y de proteasas 5%)

El homogenado se hizo pasar a través de un bisel de la aguja de una jeringa hipodérmica con agujas de 27G para romper las fracciones que permanecieran enteras. El estudio se llevó a cabo mediante dos procedimientos: por zimografía en gel de gelatina y por zimografía en gel de caseína.

4.3.1 Zimografía en gel de gelatina

Las muestras obtenidas previamente se sometieron a zimografía en gel en la que las proteínas se separan en función de su peso por electroforesis en condiciones desnaturizantes (con dodecilsulfato sódico, SDS) no reductoras. Las muestras previamente homogeneizadas se diluyeron en un tampón de carga 4x (Tris-HCl 250mM pH6,8, SDS 8%, glicerol 10%, DTT 2%, azul de bromofenol) 3:1 y se cargaron 15 µg de muestra previamente calentada 15 min. a 37°C. La separación se realiza en un gel de poliacrilamida que contiene un sustrato específico de la metaloproteinasa a analizar (gel al 9% de poliacrilamida con 1% de gelatina) y que se co-polimeriza con la acrilamida. Durante la electroforesis, el SDS provoca la desnaturización de la enzima y por tanto su inactivación. Tras la electroforesis, el gel se lava 1 h en agitación a temperatura ambiente en un tampón de activación (Tris-HCl 50mM, CaCl₂ 6mM, ZnCl₂ 1,5µM, pH=7.4) al cual se añade Tween-20 al 2.5% y que retira el SDS que mantenía inhibida la reacción enzimática. El gel con las enzimas reactivadas se incubaba a 37°C durante *toda la noche* en el tampón de activación previamente descrito sin Tween-20, condiciones en las cuales la actividad del enzima produce la degradación del sustrato (gelatina) del gel. Después de la incubación, el gel se tiñe durante 10 min con azul de Coomassie y se va destiñendo con una solución de desteñido (ácido acético 10%, metanol 40%) hasta que aparecen en el gel bandas claras sobre un fondo azul, que indican donde el sustrato ha sido degradado por las MMPs. Se transfirió entonces el gel a la solución de parada (90% H₂O, 10% ácido acético) y se digitalizó en

escala de grises con un escáner. La imagen fue densitometrada y cuantificada (Snoek-van Beurden P and Von den Hoff JW 2005). La cuantificación de las bandas se realizó mediante el programa Image J Software versión 1.42q (NIH, Maryland, USA).

4.3.2 Zimografía en gel de caseína

Para estudiar la actividad de MMP-3 se utilizó un sustrato de caseína. La separación de las proteínas en la electroforesis se realiza en un gel de caseína al 12% (Life Technologies, España) siguiendo el mismo protocolo de la zimografía de gelatina con la única diferencia en la cantidad de proteína cargada, que en este protocolo ha sido de 30µg.

4.4 Actividad de t-PA

La determinación de la actividad t-PA se estudió utilizando las muestras de hipocampo empleadas en el estudio de las metaloproteinasas. El estudio se llevó a cabo mediante zimografía en gel de t-PA.

4.4.1 Zimografía en gel de t-PA

Para estudiar la actividad de t-PA se utilizó un sustrato de caseína (Life Technologies, España) y plasminógeno (Merck-Millipore, Alemania). La separación de las proteínas en la electroforesis se realiza en un gel de caseína al 12% con un 1% de plasminógeno siguiendo el mismo protocolo de la zimografía de gelatina con la única diferencia del tampón de activación (Tris-HCl 0.1M, glicina 0.1M, EDTA 0.01M, pH=8).

5. Inmunohistoquímica

5.1 Preparación del tejido

Se anestesiaron los animales con pentobarbital y se perfundieron transcárdialmente con 50ml de una solución tamponada de fosfato (PB) 0.1M con pH=7,4 seguida de 50ml de una solución fijadora de paraformaldehído al 4%. Se extrajeron los cerebros y se post-fijaron en solución de paraformaldehído al 4% toda la noche a 4°C para transferirlos después a una

solución de sacarosa al 30%. Se congelaron los cerebros mediante su inclusión en Tissue-Tek y se realizaron cortes seriados de 30 μm de todo el cerebro en el criostato (Leica CM1950, Leica Microsystems, Nussloch, Alemania). Los cortes se conservaron en una solución de crioprotección (etilenoglicol 30%, sacarosa 30%) a -20°C .

5.2 Técnica inmunohistoquímica

Los cortes atemperados se lavaron en PB y en PBT (PB conteniendo Triton[®] X-100 0.1%) y se bloquearon durante una hora con una solución de bloqueo (0.5% BSA, 10% suero de caballo en PB 0.1%, Triton[®] X-100) para minimizar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación, se incubaron toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios (tabla 6) diluidos en la misma solución de bloqueo. Al día siguiente se lavaron 3 veces durante 10 min con la solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo secundario (tabla 7) diluido en la misma solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar dos veces con PBT y una vez con PB para quitar cualquier residuo de Triton, se montaron los cortes en portas (Thermo Scientific) y se cubrieron con el medio de montaje para inmunofluorescencia con marcador nuclear (ProLong Gold con DAPI, Life Technologies, España). Los cortes se examinaron en el microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axio Imager A1) y las imágenes se obtuvieron mediante la cámara asociada al microscopio (Axiocam HRc) con el objetivo de 40x. Se tomaron 12 imágenes por animal de las regiones del hipocampo giro dentado, CA1 y CA3. Para la cuantificación de estas imágenes se convirtieron a escala de grises y se midió la densidad integrada o la intensidad media del marcaje en función del anticuerpo empleado con el programa Image J (NIH).

Anticuerpo anti-	Referencia	Huesped	Dilución	Casa Comercial
Colágeno IV	ab 19808	Conejo	1:250	Abcam (UK)
Laminina	L-9393	Conejo	1:1000	Sigma (Barcelona, España)
Iba-1	019-19741	Conejo	1:500	Wako (Japón)
GFAP	SAB2500462	Cabra	1:1000	Sigma (Barcelona, España)
S100B	ab52642	Conejo	1:500	ABCAM (UK)

Tabla 6: Resumen de los anticuerpos primarios utilizados para inmunohistoquímica.

Anticuerpo anti-	Referencia	Huesped	Dilución	Casa Comercial
AlexaFluor™ 594 anti-mouse IgG	A21203	Burro	1:1000	Life technology (Madrid, España)
AlexaFluor™ 594 anti-rabbit IgG	A21207	Burro	1:1000	Life technology (Madrid, España)
AlexaFluor™ 488 anti-rabbit IgG	A21206	Burro	1:1000	Life technology (Madrid, España)
AlexaFluor™ 594 anti-goat IgG	21468	Pollo	1:1000	Life technology (Madrid, España)

Tabla 7: Resumen de los anticuerpos secundarios utilizados para inmunohistoquímica.

5.2.1 Estudios de extravasación de inmunoglobulina G

Como marcador de alteraciones en la permeabilidad de la BHE se utilizó la cuantificación de la extravasación de IgG del torrente sanguíneo al parénquima cerebral. Los cortes histológicos fueron obtenidos como se ha descrito en el apartado anterior. Se empleó la técnica previamente descrita de

inmunohistoquímica con una sola incubación durante toda la noche del anticuerpo Alexa Fluor™ 594 donkey anti-mouse IgG.

6. Estudio de muerte neuronal: Fluoro-Jade

Los cortes histológicos fueron obtenidos como se ha descrito previamente. Después de montar los cortes en portaobjetos ionizados y dejarlos secar toda la noche, se hidrataron mediante concentraciones decrecientes de etanol, 100%, 90%, 70% durante 5 min.

A continuación los cortes se lavaron durante 1 min. en agua destilada para dejarlos en una solución de permanganato potásico 0.06% durante 15 min. Después se lavaron 1 min más y se incubaron con la solución de trabajo de Fluoro-Jade (AG325, Millipore) al 0.001% durante 30 min. Posteriormente se lavaron y deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol, 70%, 90%, 100% y finalmente con xileno durante 5 min para cubrirlos con DPX (44581, Sigma).

Los cortes se examinaron utilizando un microscopio confocal (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) y las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 20x. Por cada animal se tomaron 2 campos del giro dentado del hipocampo. A continuación se realizó una cuantificación del número de células positivas por cada campo y por cada animal.

7. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante la t de Student cuando se compararon dos grupos. Si la comparación se realizó entre tres o más grupos con el tratamiento como único factor, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test de Newman-Keuls. En los casos en que intervenían 2 factores, cepa de ratón y tratamiento, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas seguido del test Bonferroni cuando se obtuvo un valor de F significativo, usando el programa de análisis de datos GraphPad Prism® (Graph Pad Software versión 5, San Diego, EE.UU.)

RESULTADOS

1. Consumo de Etanol

Se utilizó en roedores el paradigma *Drinking in the Dark* (DID), aceptado actualmente como modelo de *binge drinking*. A pesar de existir cierta controversia en las opiniones de los distintos autores, la mayoría coinciden en definir *binge drinking* como el consumo de 5 bebidas durante 2h consecutivas en el hombre y de 4 bebidas durante 2h en la mujer alcanzando unos niveles plasmáticos de, al menos, 80 mg/dl. En ratones se habla de *binge drinking* cuando la concentración de etanol en la sangre alcanza al menos 100 mg/dl (Lyons et al., 2008). El DID representa un modelo reproducible de intoxicación por etanol sin que llegue a haber dependencia (Lowery et al., 2010). Los animales tuvieron acceso al etanol durante 4 días consecutivos: los primeros 3 días durante 2h y el cuarto día durante 4h. En la figura 22 se pueden observar las cantidades de etanol consumidas por los ratones a lo largo de los 4 días en gramos de etanol por kilogramos de peso. Los días del ciclo siempre corresponden a lunes (día 1), martes (día 2), miércoles (día 3), jueves (día 4). El análisis cuantitativo mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo ($F_{3,18}=13.7$, $p=0.0001$) del consumo de etanol. Análisis post-hoc indican que el consumo el 4º día de exposición (6.4 ± 0.9 g/kg) fue mayor que los tres primeros días (1º día: 2.4 ± 0.24 , 2º día: 2.9 ± 0.38 , 3º día: 2.9 ± 0.3 g/kg).

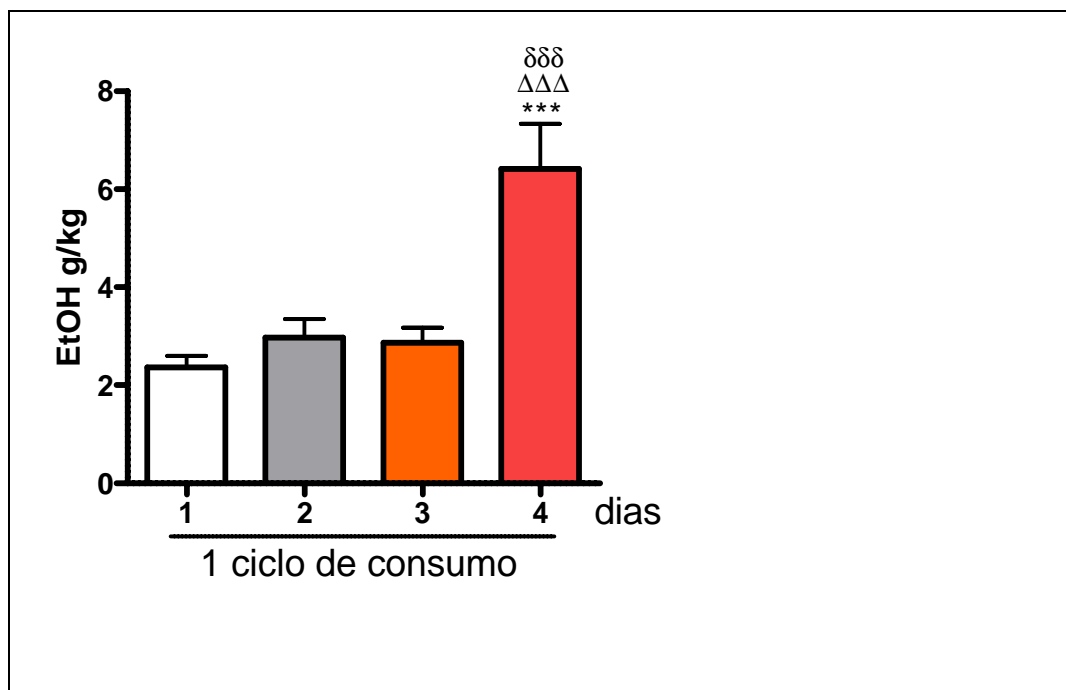


Figura 22: Consumo de etanol durante 1 ciclo de DID. Los datos muestran los gramos de etanol, por kilogramo de peso corporal, consumidos durante la semana de exposición. Los resultados muestran la media \pm E.E.M. (n=5). Diferente de día 1: *** $p < 0.0001$; diferente de día 2: $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.0001$; diferente de día 3: $\delta\delta\delta$ $p < 0.0001$.

En determinados estudios los animales se expusieron a 4 ciclos consecutivos de consumo de etanol. Entre ciclos, hubo un periodo de 3 días durante los cuales los animales no tuvieron acceso a etanol. La figura 23 representa las cantidades de etanol consumidas durante cada uno de los 4 ciclos de etanol. Las cantidades de etanol consumidas no varían a lo largo de los ciclos. El análisis mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo del consumo de alcohol durante el primer ciclo de consumo ($F_{3,51}=47.53$, $p < 0.0001$), segundo ($F_{3,49}=31.54$, $p < 0.0001$), tercero ($F_{3,50}=26.43$, $p < 0.0001$) y cuarto ($F_{3,47}=52.22$, $p < 0.0001$). Análisis post-hoc indican que el consumo de etanol el día 4 es superior al de los días 1, 2 y 3 en el 1^{er} ciclo (1^{er} día: 2.34 ± 0.27 , 2^o día: 2.13 ± 0.23 , 3^{er} día: 2.34 ± 0.25 , 4^o día: 6.22 ± 0.37 g/kg), en el 2^o ciclo (1^{er} día: 2.69 ± 0.26 , 2^o día: 1.91 ± 0.22 , 3^{er} día: 2.08 ± 0.161 , 4^o día: 5.55 ± 0.47 g/kg), en el 3^{er} ciclo (1^{er} día: 2.91 ± 0.39 , 2^o día: 2.87 ± 0.31 , 3^{er} día: 2.95 ± 0.21 , 4^o día: 5.84 ± 0.25 g/kg) y en el 4^o ciclo (1^{er} día: 2.9 ± 0.24 , 2^o día: 2.31 ± 0.17 , 3^{er} día: 2.03 ± 0.23 , 4^o día: 6.22 ± 0.38 g/kg).

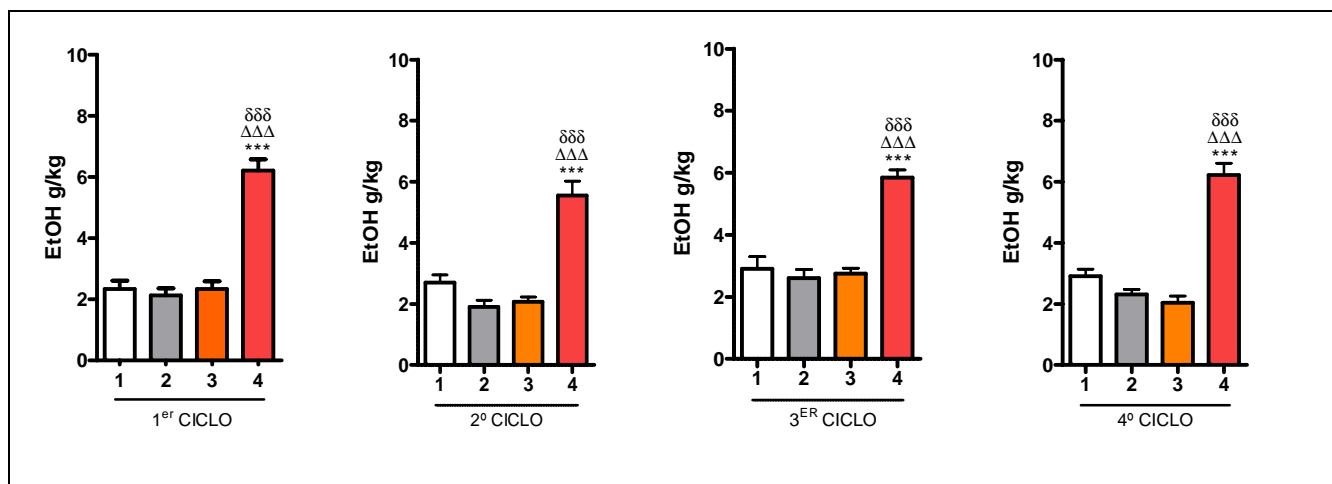


Figura 23: Consumo de etanol durante 4 ciclos consecutivos de DID. Los datos representan los gramos de etanol, por kilogramo de peso corporal, consumidos por los animales durante las 4 semanas de exposición. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n=14). Diferente de día 1: *** $p < 0.0001$; diferente de día 1: $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.0001$; diferente de día 3: $\delta\delta\delta$ $p < 0.0001$.

2. Concentración plasmática de etanol

Inmediatamente después de finalizar la exposición a etanol, el día 4 del primer ciclo, se obtuvo una muestra de sangre desde el corazón del ratón para la determinación de los niveles plasmáticos de etanol. Los niveles alcanzados fueron 135.2 ± 16 mg/dl.

3. Consumo de comida durante la exposición a etanol

Una de las limitaciones del protocolo DID, fundamentalmente en experimentos que implican varios ciclos de exposición, es el posible impacto del consumo de etanol sobre la ingesta de alimento y la consecuente variación del peso corporal. Esto es debido a que la intoxicación de etanol se produce en el periodo circadiano en el cual los animales ingieren la mayor parte de su alimento, las primeras horas del periodo de oscuridad. Por lo tanto se monitorizaron los gramos de comida consumidos durante cada uno de los días de los 4 ciclos de exposición al etanol. El ANOVA de dos vías indica que no se produce un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,347}=0.3951$, $p=0.5358$) ni del tiempo ($F_{15,347}=0.5852$, $p=0.8862$) y que no hay interacción entre los factores ($F_{15,347}=1.354$, $p=0.1681$, figura 24).

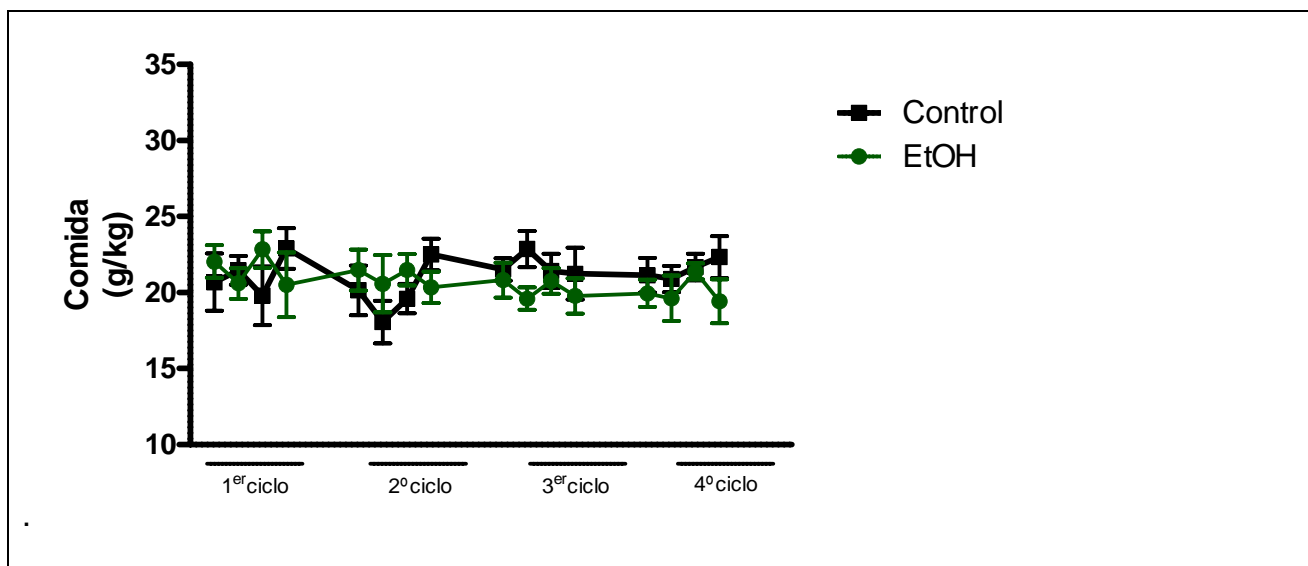


Figura 24: Consumo de comida durante 4 ciclos consecutivos de DID. Los datos representan la media del consumo de comida en gramos por kilogramo de peso corporal. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n=14).

4. Variación en el peso corporal durante la exposición a etanol

En la figura 25 se observa el peso de los ratones durante las semanas de exposición a etanol. El ANOVA de dos vías indica que no se produce un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,26}=0.9885$, $p=0.3293$) pero si del tiempo ($F_{26,390}=7.322$, $p<0.0001$) y que no hay interacción entre los factores ($F_{26,390}=0.6838$, $p=0.8009$). La ganancia de peso al finalizar los ciclos en los animales controles y en los expuestos a etanol fue de 0.73g y de 0.51g, respectivamente (figura 25).

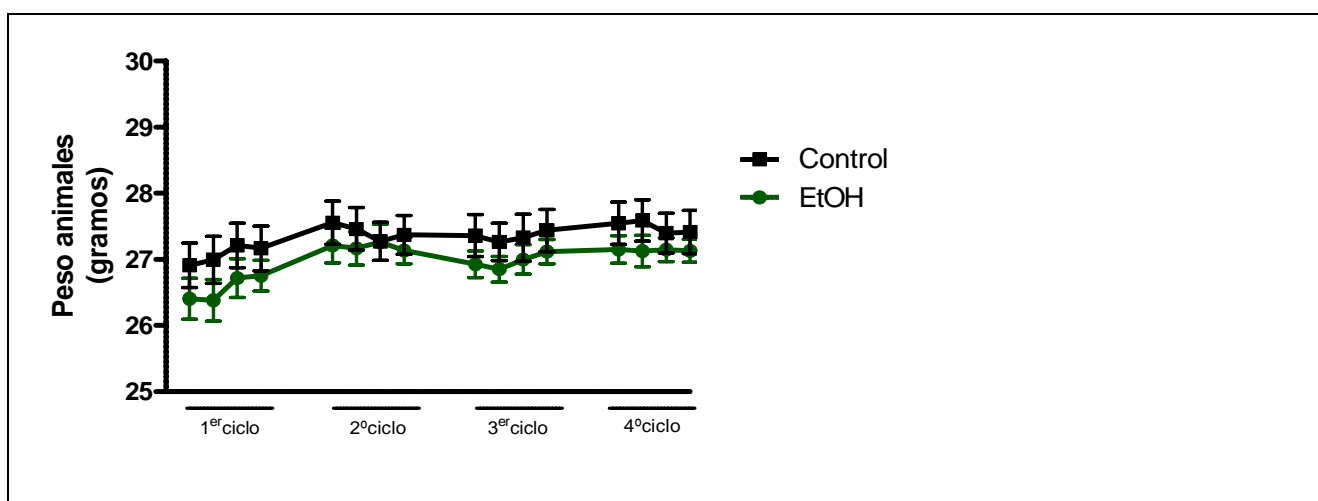


Figura 25: Peso corporal de los animales durante 4 ciclos consecutivos de DID. Los datos representan el peso corporal expresado en gramos. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. ($n=14$).

5. Temperatura rectal durante la exposición a etanol

La temperatura rectal de los animales se midió antes de iniciar la exposición a etanol e inmediatamente después de su retirada. El análisis cuantitativo mediante ANOVA de dos vías indica que no se produce un efecto significativo del tratamiento ($F_{1,136}=0.1874$, $p=0.6658$) ni del tiempo ($F_{3,136}=1.452$, $p=0.2305$) y que no hay interacción entre los factores ($F_{3,136}=0.5891$, $p=0.6232$).

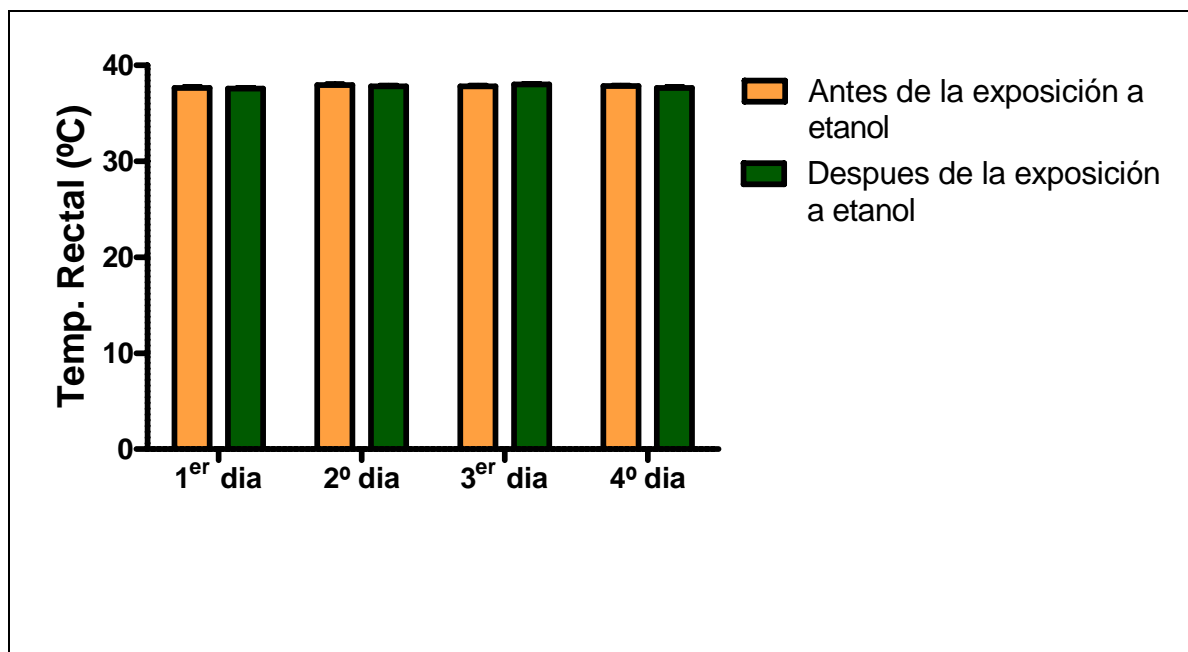


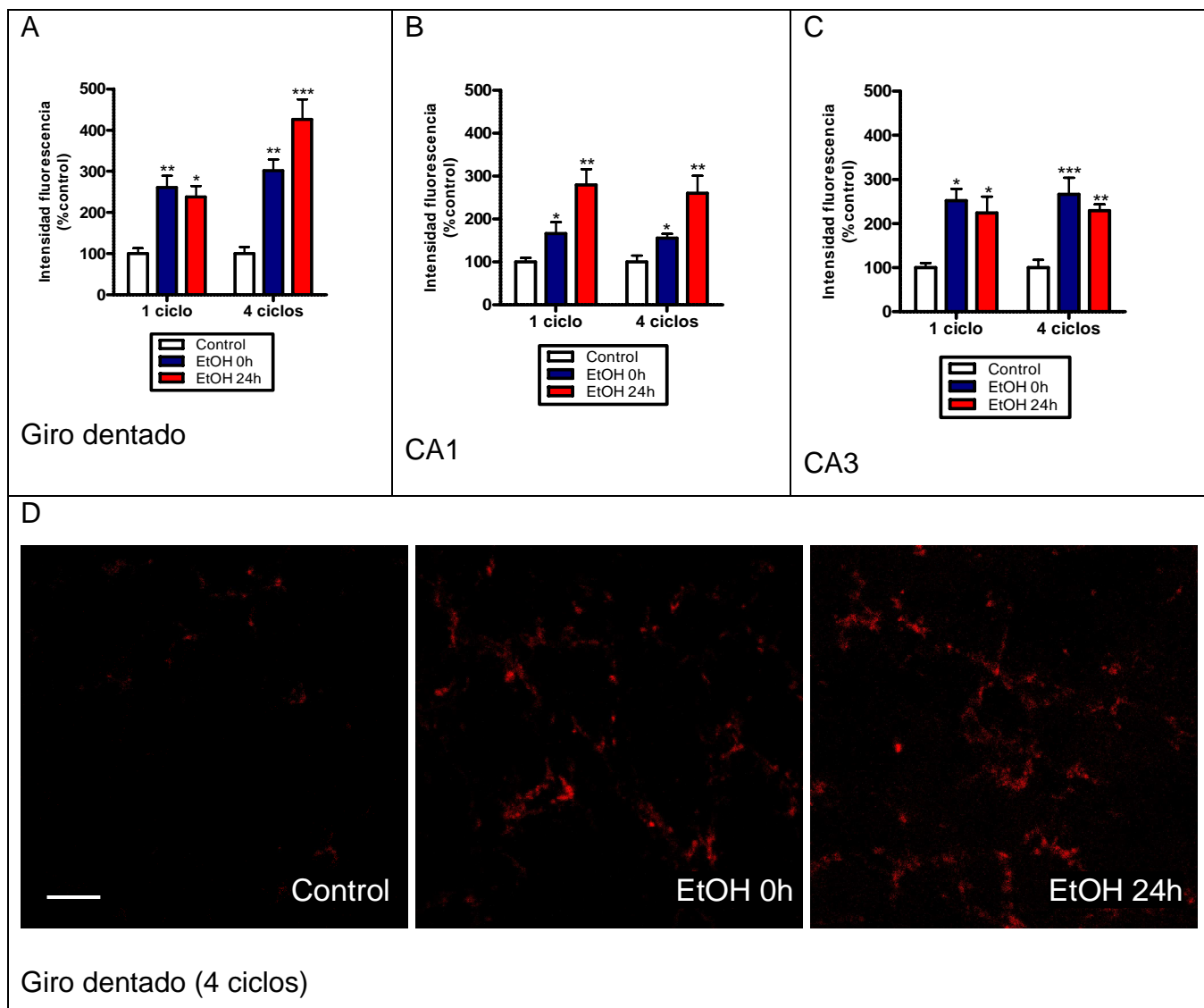
Figura 26: Temperatura rectal de los animales antes e inmediatamente después de haber retirado el etanol. Los datos representan la media de la temperatura rectal en grados centígrados durante los 4 días que componen un ciclo DID. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. (n=18).

6. Efecto de etanol sobre la extravasación de Inmunoglobulina G

La barrera hematoencefálica (BHE) regula el transporte de nutrientes y otras sustancias e impide el transporte de toxinas desde la sangre al cerebro. Uno de los marcadores de la ruptura o del aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica es la aparición de proteína endógena inmunoglobulina G (IgG) en el parénquima cerebral. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol (0h) o 24h más tarde.

En este estudio, se procedió a analizar la inmunorreactividad a IgG en hipocampo. El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 1 ciclo de etanol en giro dentado ($F_{2,11}=10.25$; $p=0.0062$), CA1 ($F_{2,11}=20.58$; $p=0.0012$) y CA3 ($F_{2,11}=5.578$; $p=0.0236$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad a IgG en las tres zonas del hipocampo inmediatamente después de finalizar el consumo (160.6% en giro dentado, 66% en CA1 y 151.5% en CA3) y a las 24h

(137.9% en giro dentado, 179.4% en CA1 y 124.2% en CA3). El ANOVA de una vía también reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos en giro dentado ($F_{2,15}=21.71$; $p<0.0001$), CA1 ($F_{2,15}=9.401$; $p=0.0023$) y CA3 ($F_{2,15}=14.31$; $p=0.0004$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad a IgG en las tres zonas del hipocampo inmediatamente después de finalizar el consumo (201.6% en giro dentado, 66.1% en CA1 y 166.3% en CA3) y a las 24h (326.1% en giro dentado, 179.4% en CA1 y 128.8% en CA3; figura 27).



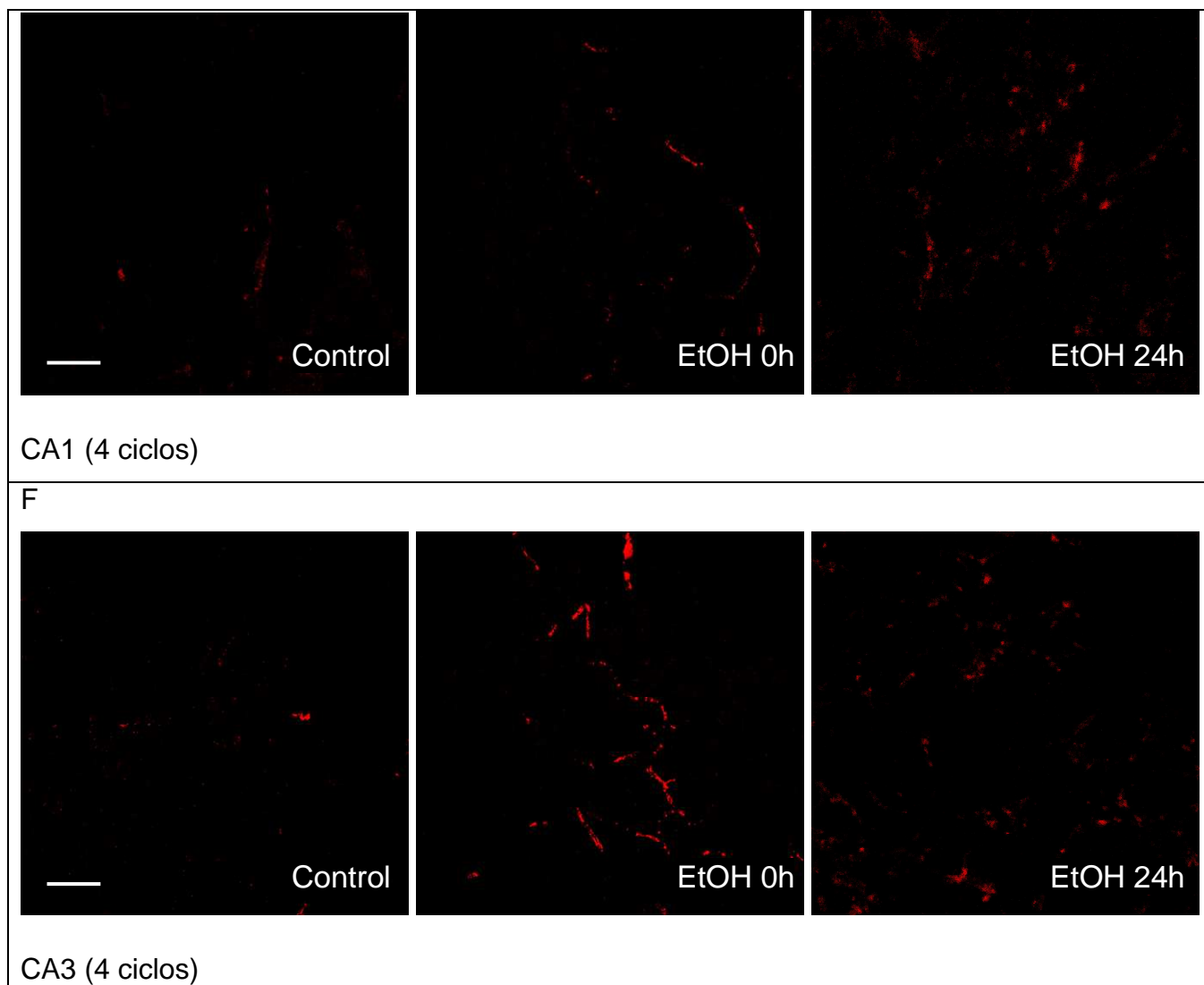


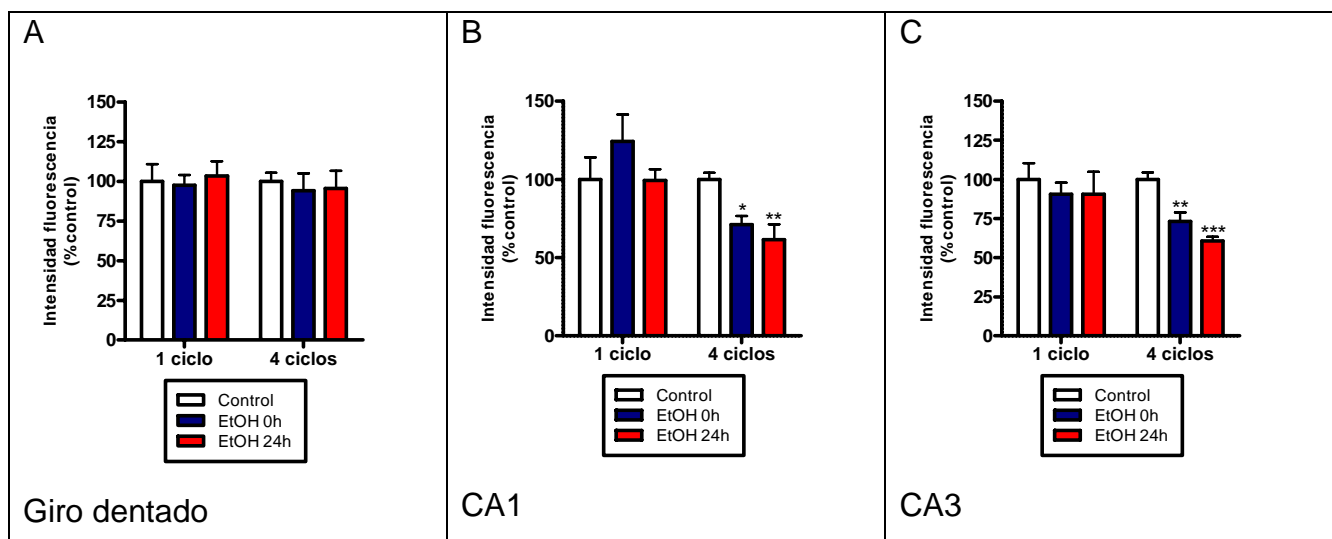
Figura 27. Efecto del etanol sobre la extravasación de IgG en hipocampo. Las gráficas representan la cuantificación de la inmunorreactividad de IgG en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C) tras 1 y 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol o a las 24h. Las figuras muestran imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en la inmunorreactividad de IgG endógena en giro dentado (D), CA1 (E) y CA3 (F) tras la exposición a 4 ciclos de etanol. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

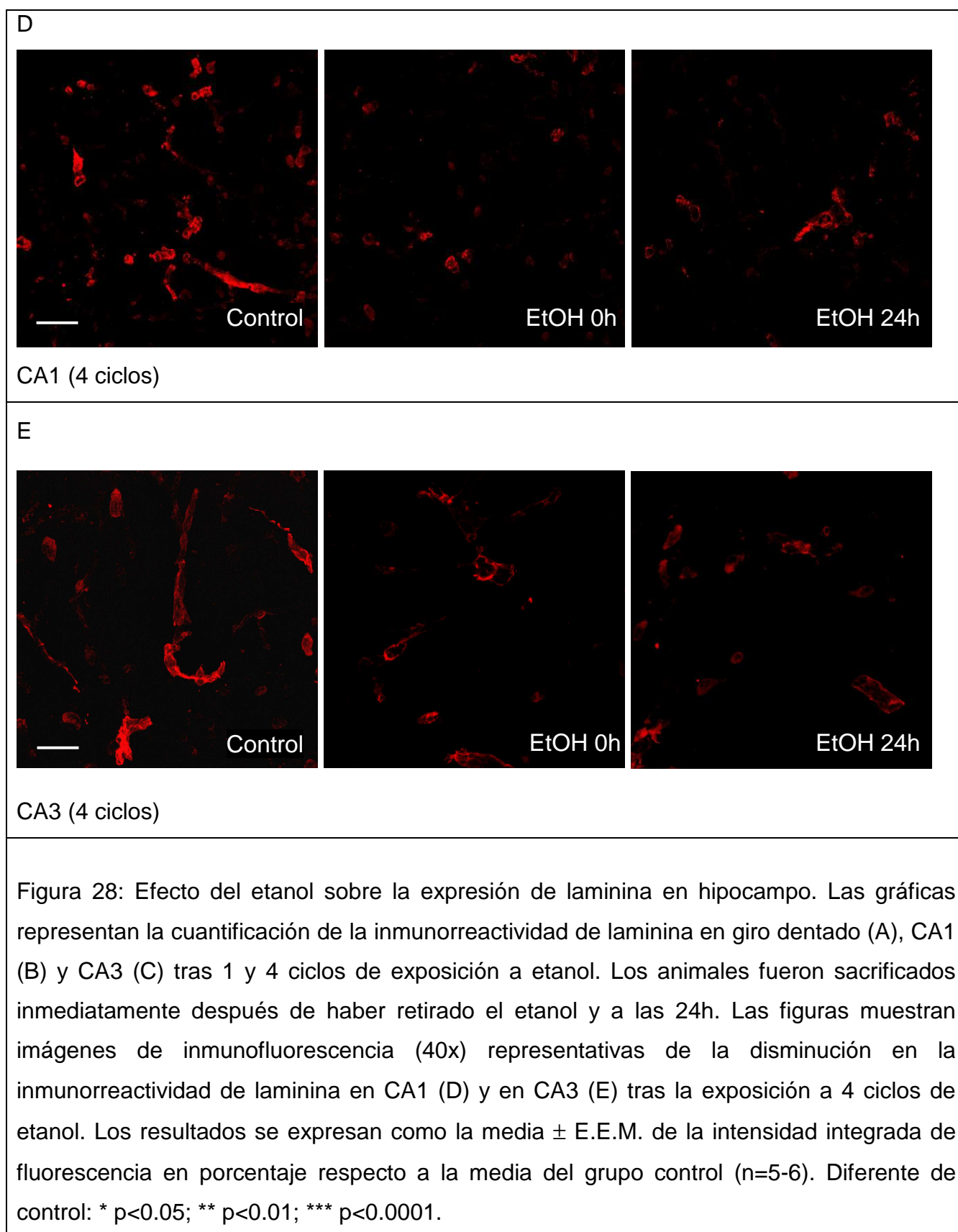
7. Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de laminina y colágeno IV

Como muestran los resultados del apartado anterior, la exposición a etanol induce un aumento en la extravasación de IgG. Siendo la extravasación de esta inmunoglobulina en el parénquima cerebral un marcador de la ruptura o del aumento de permeabilidad de la BHE se procedió al análisis de la expresión de dos de las principales proteínas componentes de la lámina basal, laminina y colágeno tipo IV. El estudio se efectuó mediante inmunohistoquímica en giro dentado, CA1 y CA3. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol (0h) o 24h más tarde.

7.1 Inmunorreactividad de laminina

En este estudio, se procedió a analizar la inmunorreactividad de laminina. El ANOVA de una vía reveló la ausencia de efecto significativo producido por la exposición a 1 ciclo de etanol en giro dentado ($F_{2,14}=0.1086$; $p=0.8980$), CA1 ($F_{2,14}=0.2576$; $p=0.7771$) y CA3 ($F_{2,14}=0.9563$; $p=0.4141$; figura 28). Sin embargo el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol en CA1 ($F_{2,18}=8.210$; $p=0.0029$) y CA3 ($F_{2,18}=25.76$; $p=0.0001$). Este efecto no se observó en giro dentado ($F_{2,18}=0.1033$; $p=0.9024$). Los análisis post-hoc indican que el etanol induce una disminución en la inmunorreactividad de laminina inmediatamente después de finalizar el consumo en CA1 (28.7%) y en CA3 (26.8%) y 24h más tarde en CA1 (38.6%) y en CA3 (39.4%, figura 28 B, C).

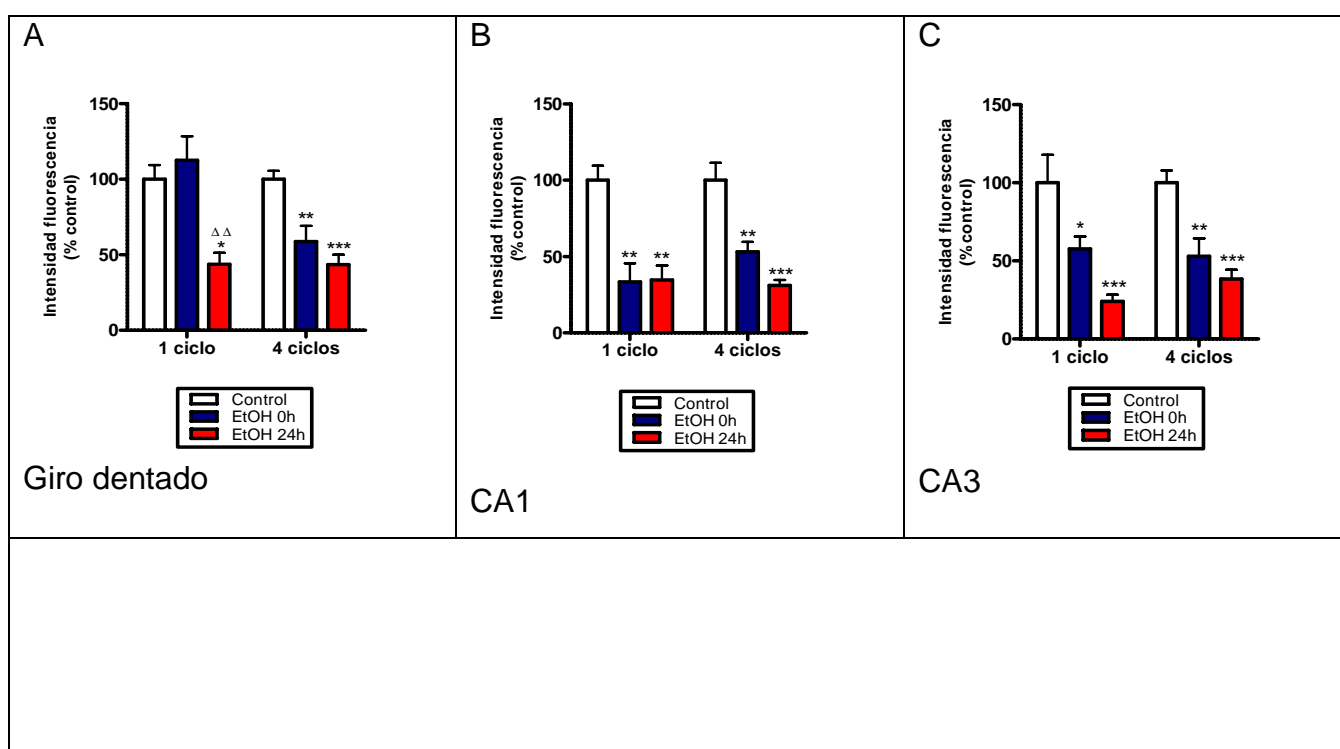




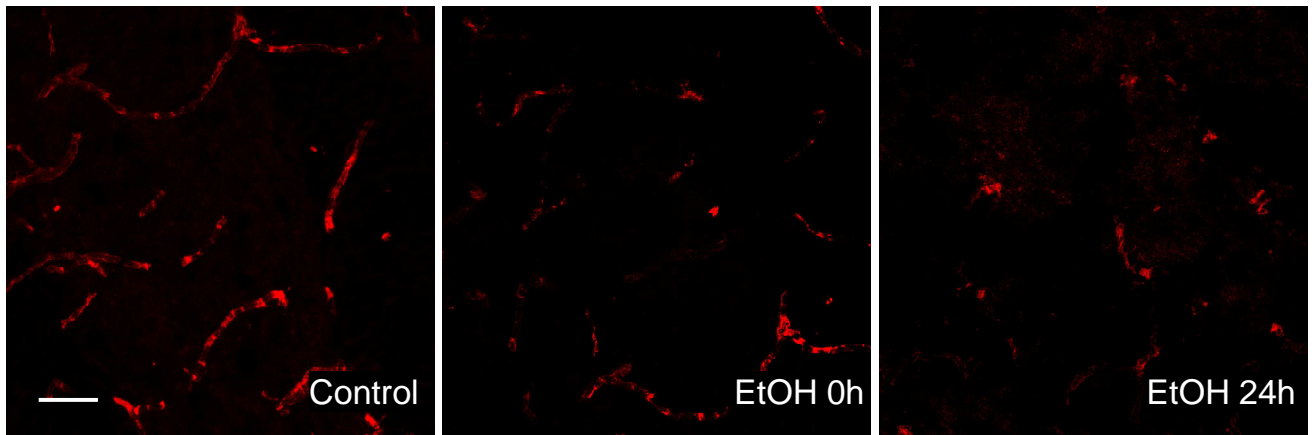
7.2 Inmunorreactividad de colágeno IV

En este estudio, se procedió a analizar la inmunorreactividad de colágeno IV en hipocampo. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol (0h) o 24h más tarde.

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 1 ciclo de etanol en giro dentado ($F_{2,14}=8.682$; $p=0.004$), CA1 ($F_{2,14}=12.21$; $p=0.0009$) y CA3 ($F_{2,13}=14.70$; $p=0.0008$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una disminución en la inmunorreactividad de colágeno IV en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo inmediatamente después de finalizar el consumo (66.6% en CA1 y 42.3 % en CA3) y a las 24h (65.2% en CA1 y 76.1% en CA3). Sin embargo, en giro dentado solamente se aprecia esta disminución a las 24h (56.4%) (figura 29). El ANOVA de una vía también reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol en giro dentado ($F_{2,18}=15.57$; $p=0.0001$), CA1 ($F_{2,18}=18.63$; $p=0.0001$) y CA3 ($F_{2,17}=13.76$; $p=0.0002$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una reducción en la inmunorreactividad de colágeno IV en los tres subcampos del hipocampo inmediatamente después de finalizar el consumo (41.4% en giro dentado, 46.9% en CA1 y 47.1% en CA3) y a las 24h (56.6% en giro dentado, 68.8% en CA1 y 61.7% en CA3; figura 29).

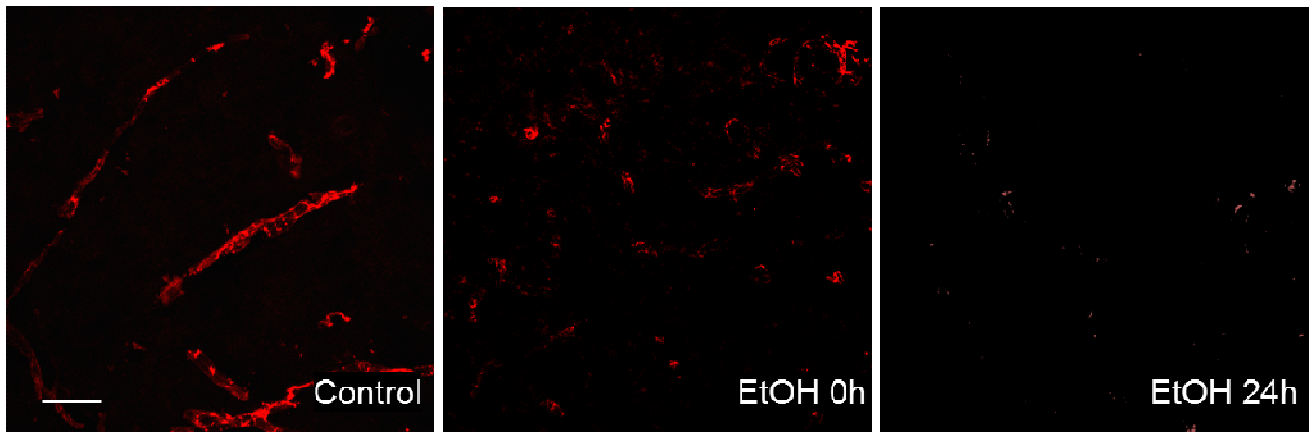


D



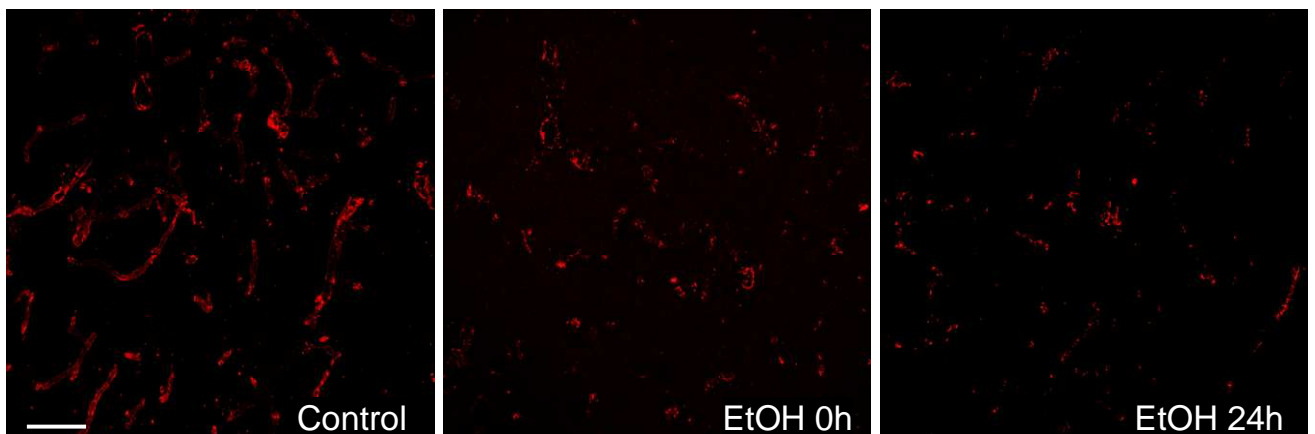
Giro dentado (4 ciclos)

E



CA1 (4 ciclos)

F



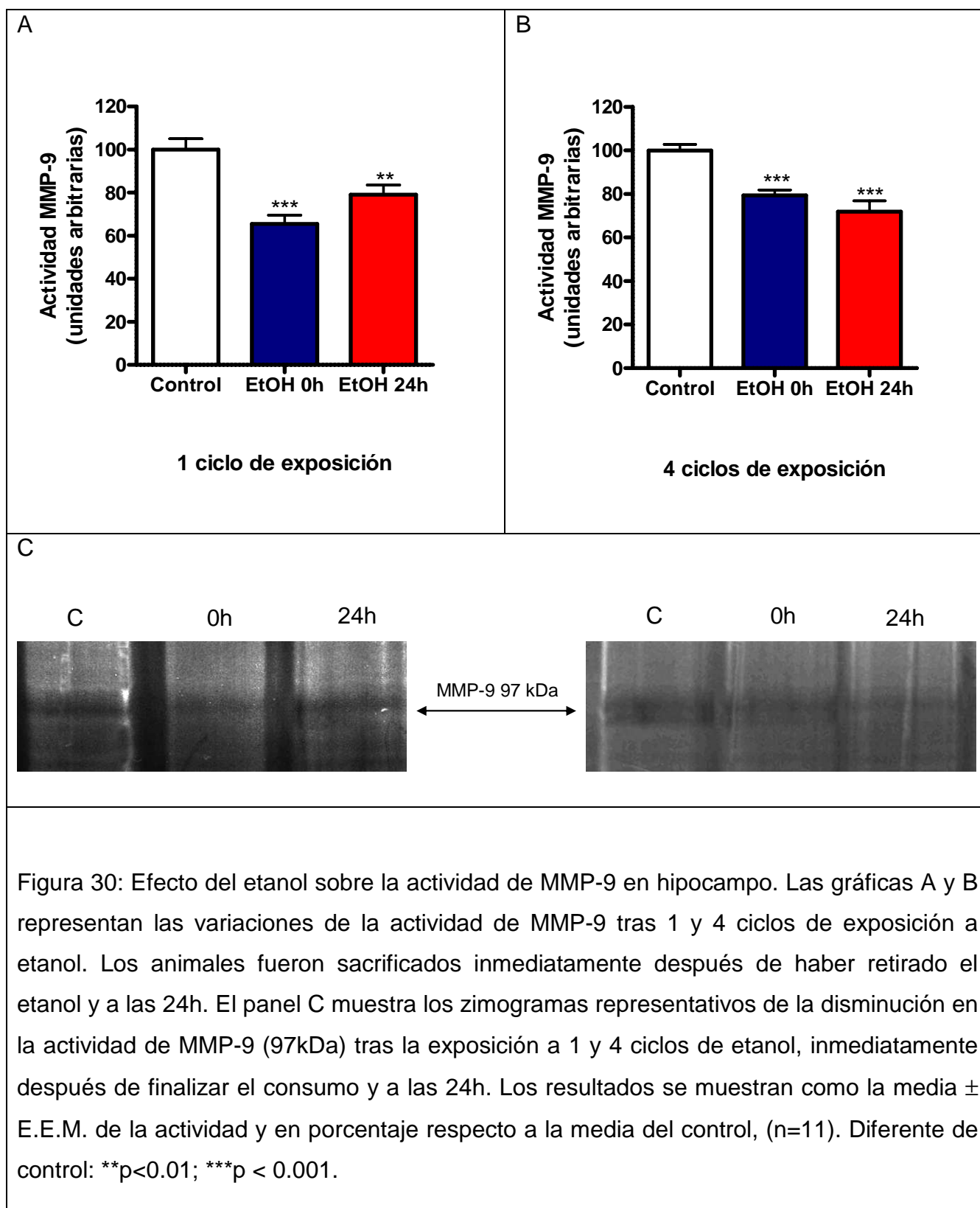
CA3 (4 ciclos)

Figura 29: Efecto del etanol sobre la expresión de colágeno IV en hipocampo. Las gráficas representan la cuantificación de la inmunorreactividad de colágeno IV en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C) tras 1 y 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. Las figuras muestran imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas de la disminución en la inmunorreactividad de colágeno IV en giro dentado (D), CA1 (E) y CA3 (F) tras la exposición a 4 ciclos de etanol. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$. Diferente de EtOH 0h: $\Delta\Delta$ $p < 0.01$.

8. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática de MMP-9 y MMP-2

Las enzimas metaloproteinasas han sido involucradas en gran variedad de procesos celulares tales como proliferación celular, angiogénesis, plasticidad neuronal o alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Asahi et al., 2001). Teniendo en cuenta que estas proteasas tienen como sustratos componentes de la matriz extracelular (Savarin et al., 2011) y considerando los resultados mencionados anteriormente, se determinó la actividad enzimática de las dos principales metaloproteinasas con actividad gelatinasa MMP-2 (gelatinasa A) y MMP-9 (gelatinasa B), inmediatamente después de haber retirado el etanol y 24 h más tarde. Las determinaciones se realizaron tanto en animales sometidos a un ciclo de exposición de alcohol, como en animales sometidos a 4 ciclos. La figura 30 ilustra un zimograma representativo del hipocampo de un ratón control y de ratones expuestos a etanol. El análisis zimográfico revela la existencia únicamente de formas activas de MMPs. Aparecen dos bandas para gelatinasas: MMP-9 activa a 97kDa y MMP-2 activa a 64kDa. La exposición a etanol produjo cambios en la actividad de MMP-9 en el hipocampo pero no en la actividad de MMP-2. El análisis cuantitativo mediante ANOVA de una vía de los datos obtenidos de las imágenes reveló un efecto significativo producido por la exposición a 1 ciclo de etanol sobre la actividad de la MMP-9 ($F_{2,21}=12.76$, $p=0.0003$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una disminución en la actividad de MMP-9 inmediatamente después de finalizar el consumo (34.5%) y a las 24h (20.9%). Del mismo modo el ANOVA de una vía revela un efecto significativo

producido por la exposición a 4 ciclos de etanol ($F_{2,26}=20.53$, $p<0.0001$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una disminución en la actividad de MMP-9 inmediatamente después de finalizar el consumo (20.7%) y a las 24h (28.1%; figura 30).



Respecto a MMP-2, el análisis cuantitativo de las imágenes mediante ANOVA de una vía revela que la exposición a 1 ciclo ($F_{2,22}=0.9247$, $p=0.4122$) o a 4 ciclos ($F_{2,27}=0.9079$, $p=0.4163$) de etanol no produjo cambios sobre la actividad de esta gelatinasa (figura 31).

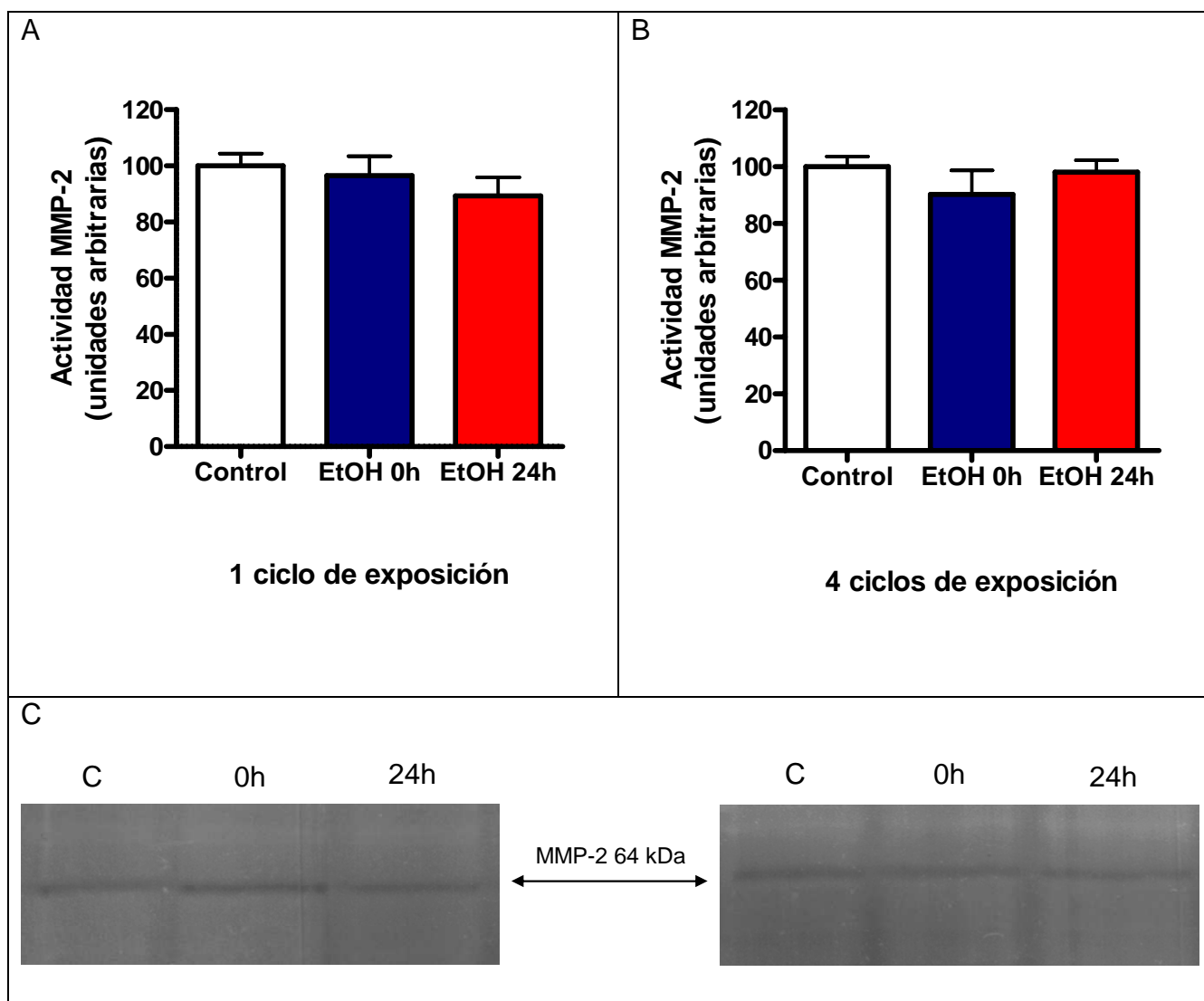


Figura 31: Efecto del etanol sobre la actividad de MMP-2 en hipocampo. Las gráficas A y B representan la actividad de MMP-2 tras 1 y 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. La figura C muestra los zimogramas representativos de la actividad de MMP-2 (64kDa) tras la exposición a 1 y 4 ciclos de etanol, inmediatamente después de finalizar el consumo y a las 24h. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. de la actividad y en porcentaje respecto a la media del control, (n=12).

9. Cambios inducidos por etanol en la respuesta glial

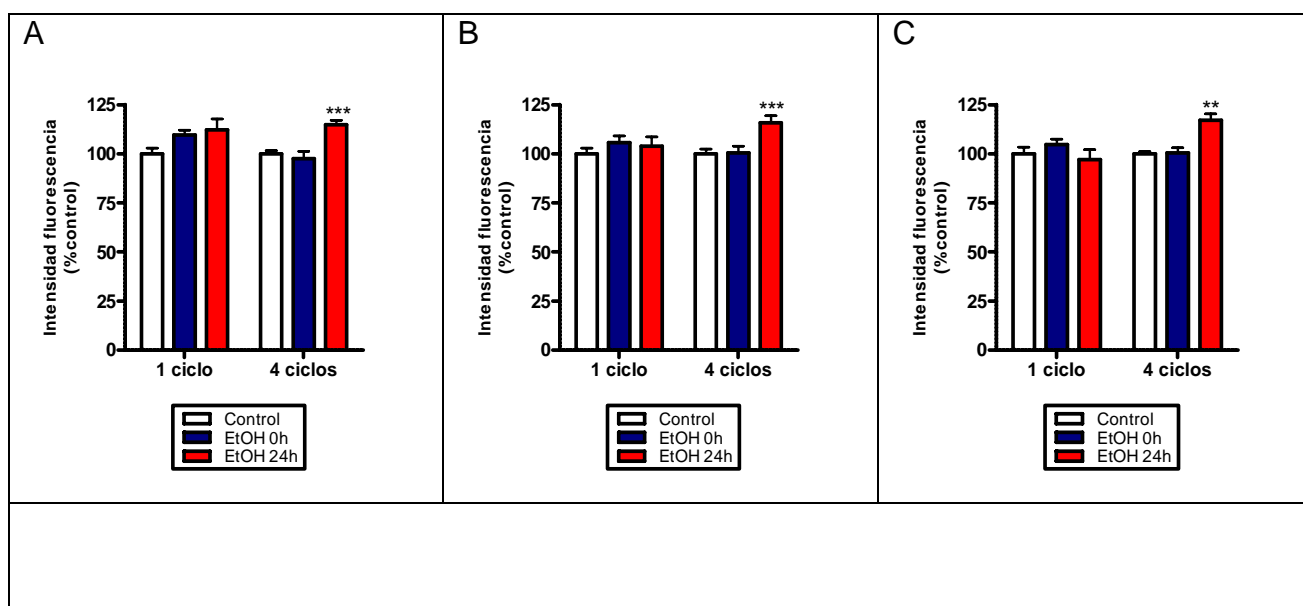
El etanol, en algunos modelos experimentales de consumo agudo y crónico, tanto en animales como en humanos, aumenta la activación microglial y astrogial (Ende et al., 2006; Sripathirathan et al., 2009).

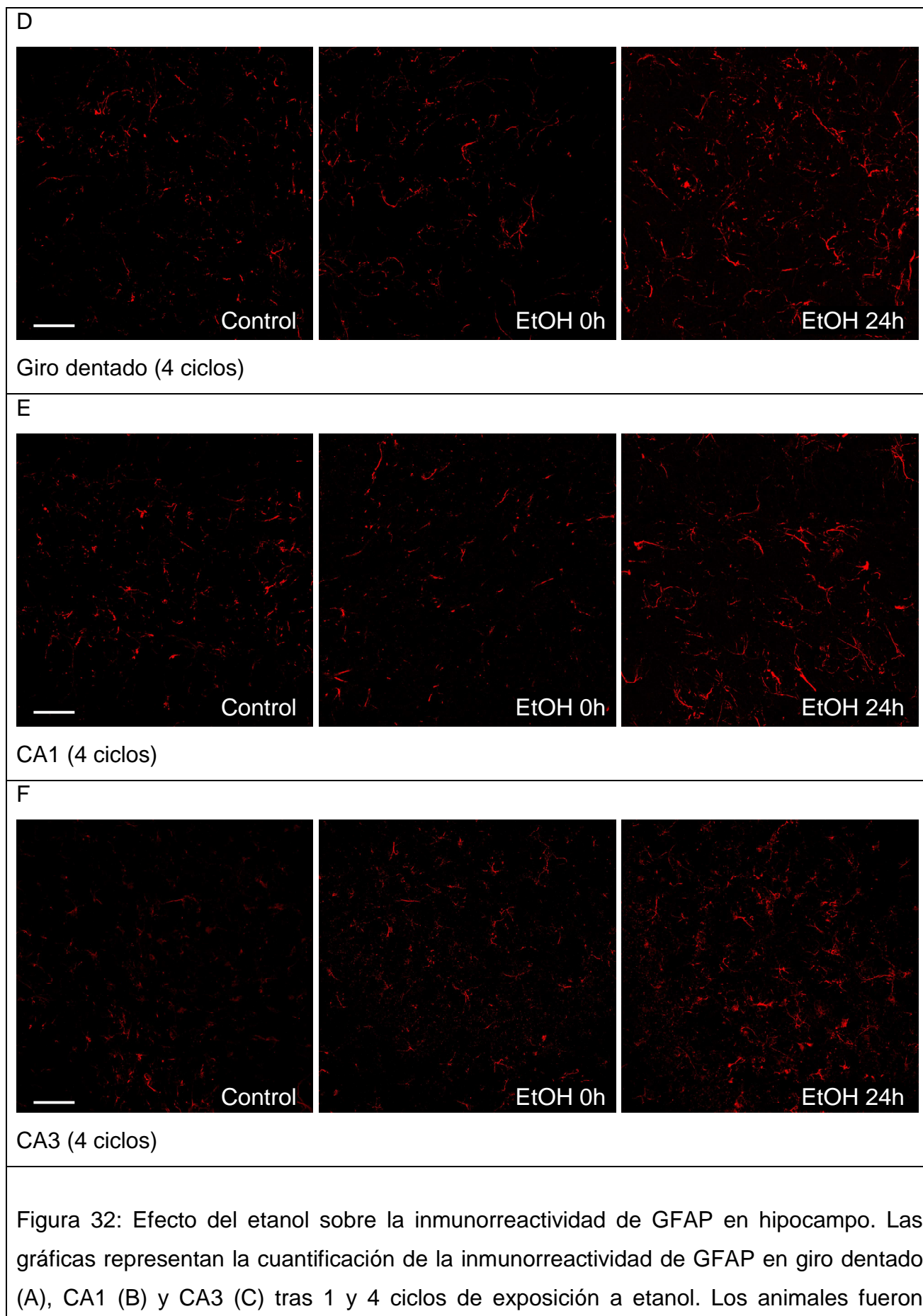
Se estudió la respuesta glial en animales que habían consumido etanol durante 1 ciclo o durante 4 ciclos de DID. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol o 24 h más tarde.

9.1 Efecto del etanol en la respuesta astrogial

9.1.1 Inmunorreactividad de GFAP

Utilizando el marcador astrogial GFAP se ha estudiado la respuesta astrogial al etanol en hipocampo. El ANOVA de una vía revela la ausencia de efecto producido por la exposición a 1 ciclo de etanol sobre la inmunorreactividad de GFAP en giro dentado ($F_{2,14}=2.422$; $p=0.1250$), CA1 ($F_{2,15}=0.9833$; $p=0.3985$) y CA3 ($F_{2,15}=5.322$; $p=0.5987$). Sin embargo, en los animales expuestos a 4 ciclos de etanol, el ANOVA de una vía revela un efecto significativo producido por el etanol en giro dentado ($F_{2,18}=14.81$; $p=0.0002$), CA1 ($F_{2,18}=14.31$; $p=0.0002$) y CA3 ($F_{2,18}=7.748$; $p=0.0037$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad de GFAP en los tres subcampos del hipocampo únicamente 24h después de finalizar el consumo (14.7% en giro dentado, 15.7% en CA1 y 16.9% en CA3; figura 32).



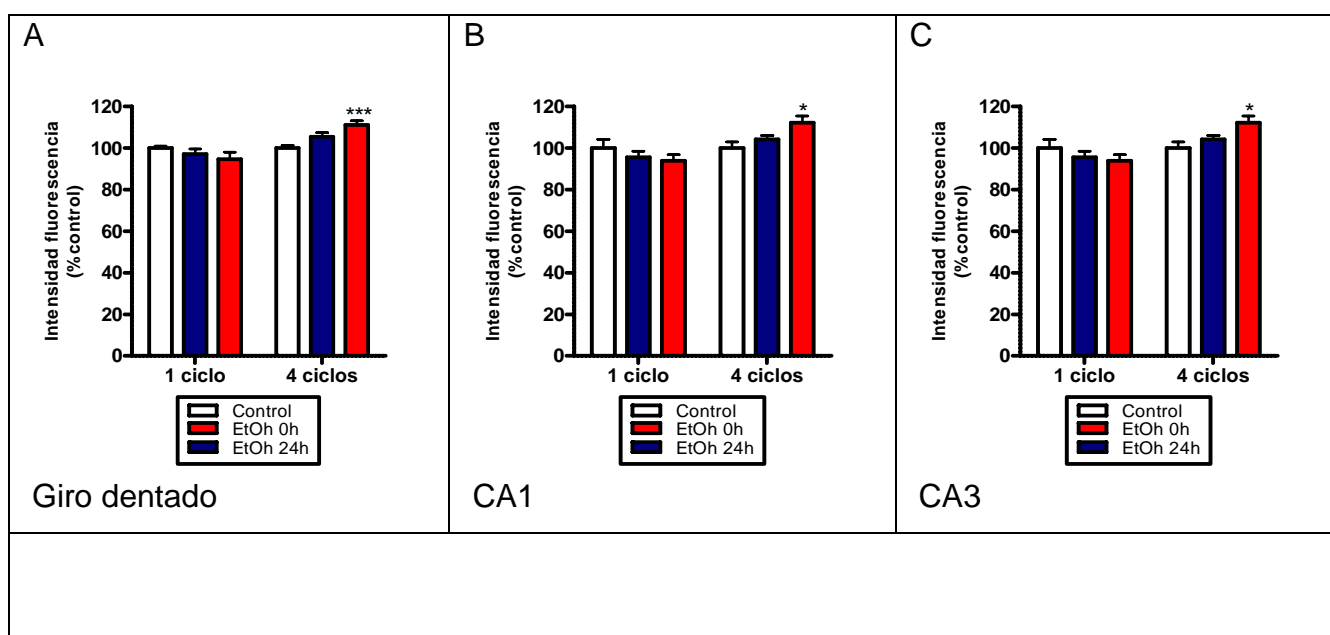


sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. Las figuras muestran imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en la inmunorreactividad de GFAP en giro dentado (D), CA1 (E) y CA3 (F) tras la exposición a 4 ciclos de etanol. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n = 5-6). Diferente de control: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

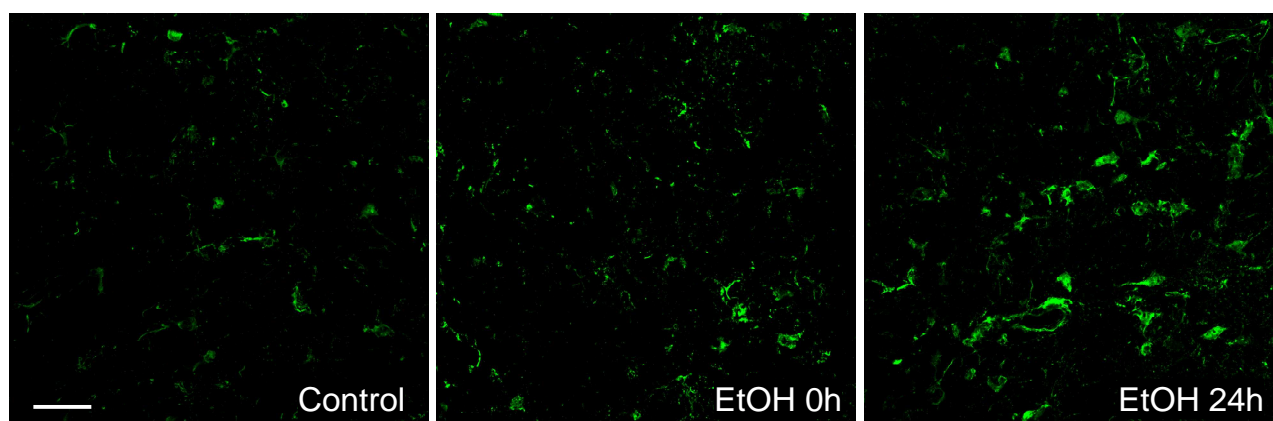
9.1.2 Inmunorreactividad de S100B

Para estudiar las poblaciones astrocitarias además de GFAP, se estudió la expresión de S100B. Este marcador es un péptido de unión al calcio. Se localiza en los astrocitos que expresan GFAP que han perdido su potencial como células madre neurales y que se encuentran en una etapa de desarrollo más maduro (Himeda et al., 2006).

El ANOVA de una vía determinó la ausencia de efecto producido por la exposición a 1 ciclo de etanol sobre la inmunorreactividad de S100B en giro dentado ($F_{2,13}=1.034$; $p=0.3830$), CA1 ($F_{2,13}=0.8811$; $p=0.4377$) y CA3 ($F_{2,13}=1.860$; $p=0.1922$; figura 33). Sin embargo, el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la inmunorreactividad de S100B en giro dentado ($F_{2,18}=9.972$; $p=0.0012$), CA1 ($F_{2,18}=5.191$; $p=0.0166$) y CA3 ($F_{2,18}=5.019$; $p=0.0194$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad a S100B en los tres subcampos del hipocampo únicamente 24h después de haber finalizado el consumo (11.1% en giro dentado, 12.2% en CA1 y 10.5% en CA3; figura 33).

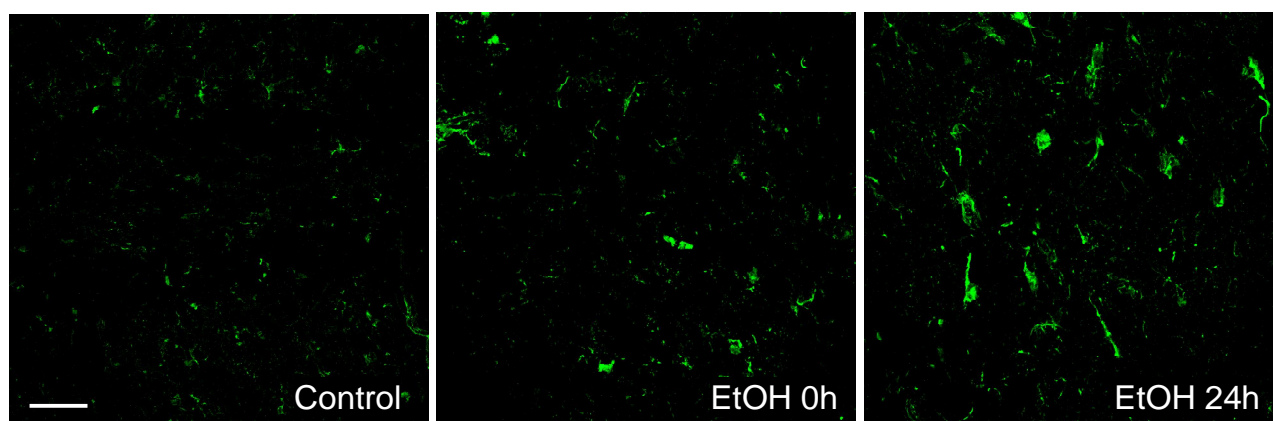


D



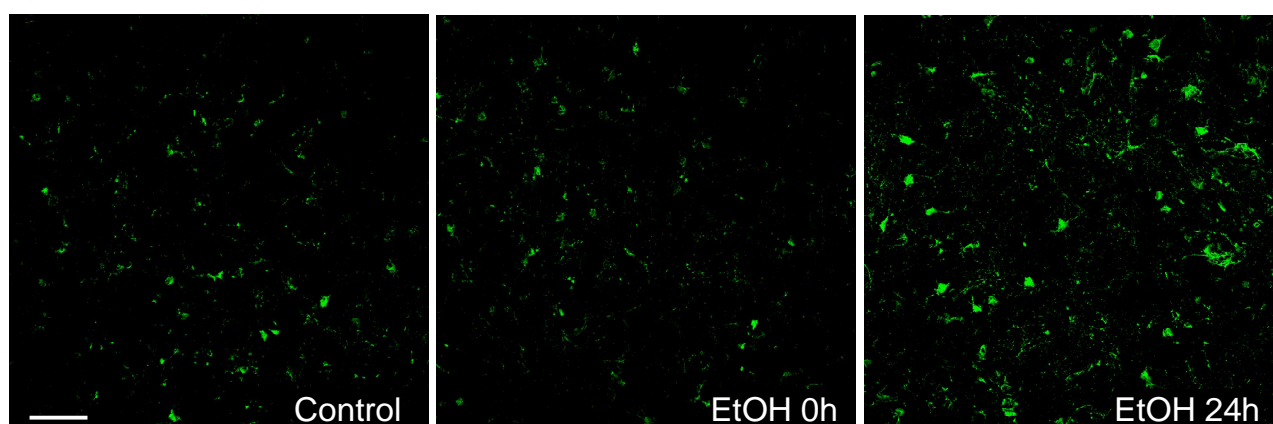
Giro dentado (4 ciclos)

E



CA1 (4 ciclos)

F



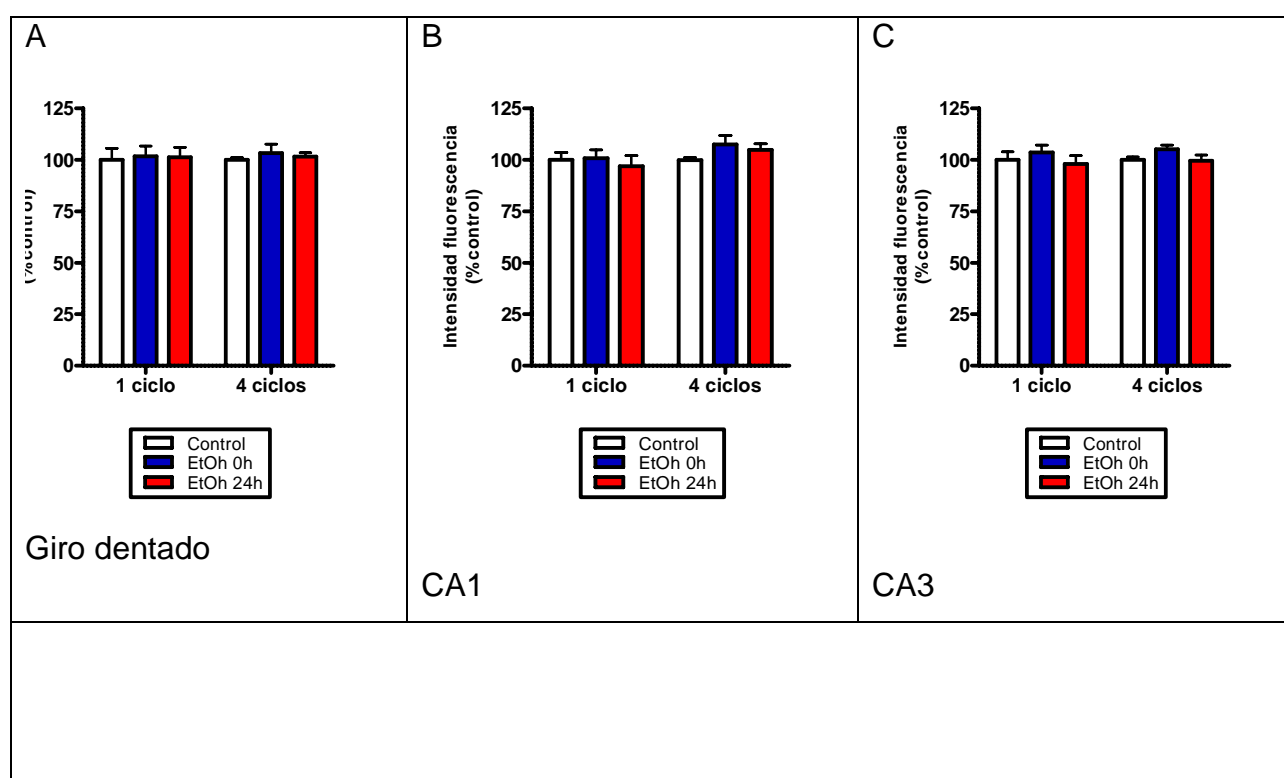
CA3 (4 ciclos)

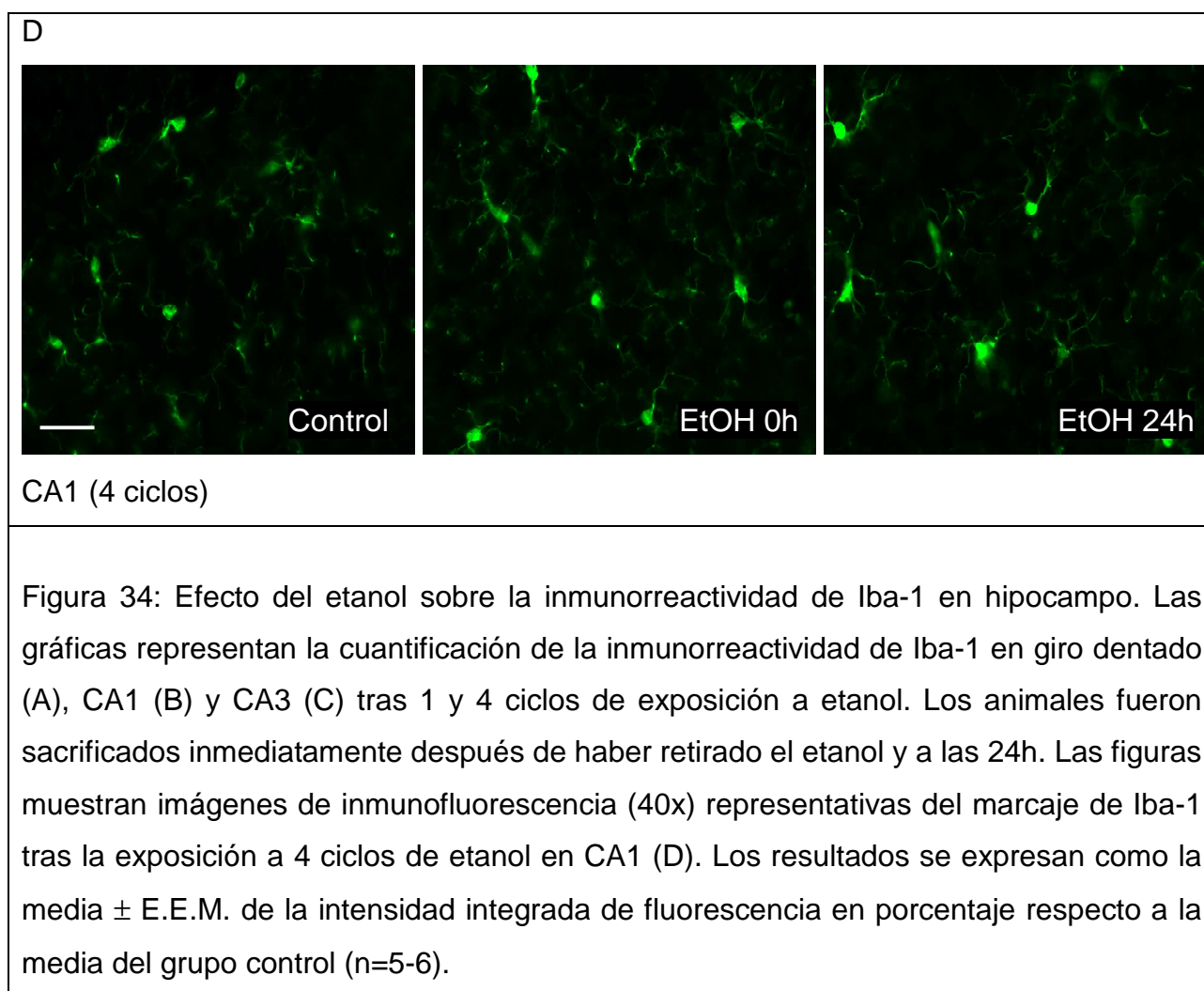
Figura 33: Efecto del etanol sobre la expresión de S100B en hipocampo. Las gráficas representan la cuantificación de la inmunorreactividad de S100B en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C) tras 1 y 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. Las imágenes de inmunofluorescencia (40x) son representativas del aumento en la inmunorreactividad de S100B en giro dentado (D), CA1 (E) y CA3 (F) tras la exposición a 4 ciclos de etanol. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$.

9.2 Efecto del etanol en la respuesta microglial

Para analizar el efecto del etanol sobre la activación microglial se estudió la inmunorreactividad de Iba-1.

El ANOVA de una vía revela que la exposición a 1 ciclo de etanol no induce ningún cambio en la inmunorreactividad de Iba-1 en los tres subcampos del hipocampo analizados en giro dentado ($F_{2,14} = 0.032$, $p = 0.9682$), CA1 ($F_{2,14} = 0.23$, $p = 0.79$) y CA3 ($F_{2,14} = 0.57$, $p = 0.57$). Resultados similares se obtuvieron después de la exposición a 4 ciclos de etanol en giro dentado ($F_{2,15} = 0.34$, $p = 0.71$), CA1 ($F_{2,15} = 1.5$, $p = 0.24$) y CA3 ($F_{2,18} = 2.19$, $p = 0.14$).



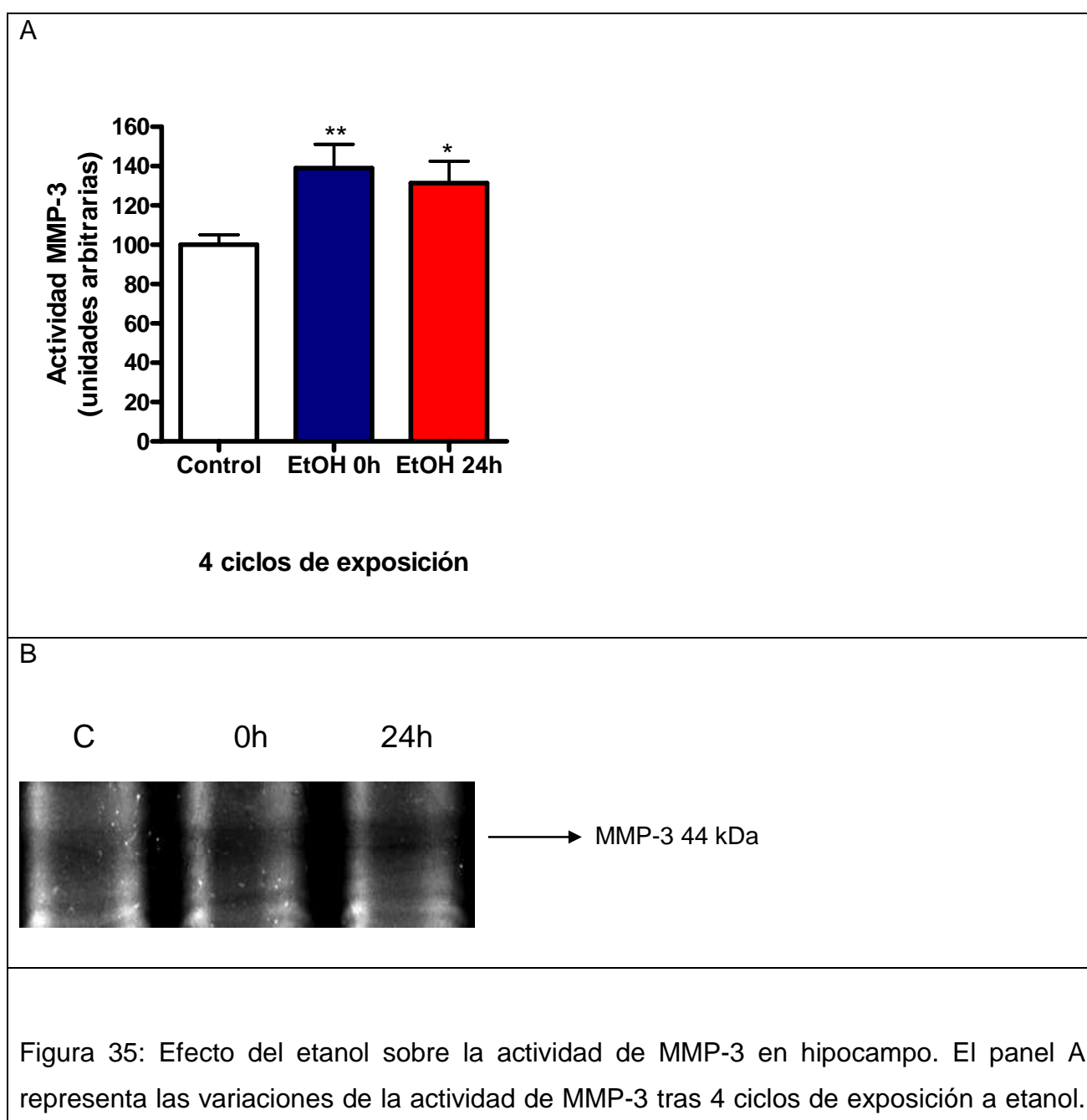


Los resultados descritos hasta aquí, indican que el efecto que produce el etanol sobre la expresión de colágeno IV en el giro dentado es más pronunciado después de 4 ciclos. Por otro lado, únicamente se observaron variaciones en la expresión de laminina, GFAP y S100B después de 4 ciclos de exposición. Por este motivo, en los estudios que se exponen a continuación se decidió utilizar el paradigma de exposición a etanol durante 4 ciclos consecutivos

10. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática de MMP-3

La estromelisina-1 o MMP-3 es un importante regulador enzimático de la remodelación de la BHE. En situaciones en las que existe una disminución en la actividad enzimática de MMP-9, un aumento de actividad enzimática MMP-3 puede contribuir a la modificación de

la BHE (Savarin et al., 2011). La actividad enzimática de MMP-3 detectada mediante zimografía en gel de caseína fue estudiada inmediatamente y 24h después de la retirada del etanol en animales sometidos a 4 ciclos de exposición al alcohol. La banda en el zimograma de caseína corresponde a la forma activa de la MMP-3 (44kDa) (figura 35). El análisis cuantitativo de las imágenes mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la actividad de la MMP-3 ($F_{2,19}=6.718$, $p=0.0071$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento de la actividad de la MMP-3 inmediatamente después de finalizar el consumo (38.9%) y a las 24h (31.3%; figura 35).

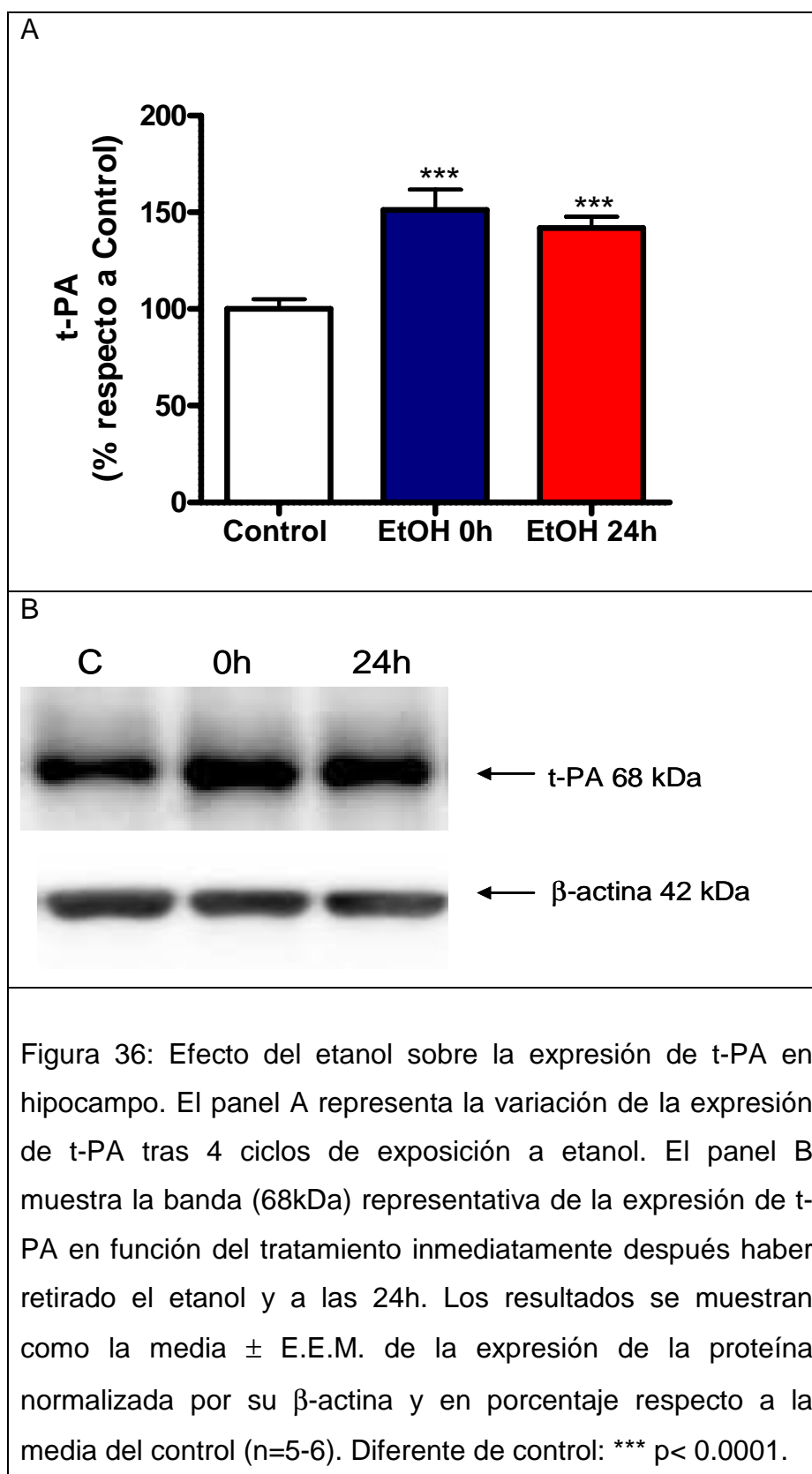


Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. El panel B muestra los zimogramas representativos del aumento de la actividad de MMP-3 (44kDa) tras 4 ciclos inmediatamente después haber retirado el etanol y a las 24h. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p<0.05$; ** $p<0.01$.

11. Efecto de etanol sobre la actividad enzimática y la expresión del activador tisular del plasminógeno (t-PA)

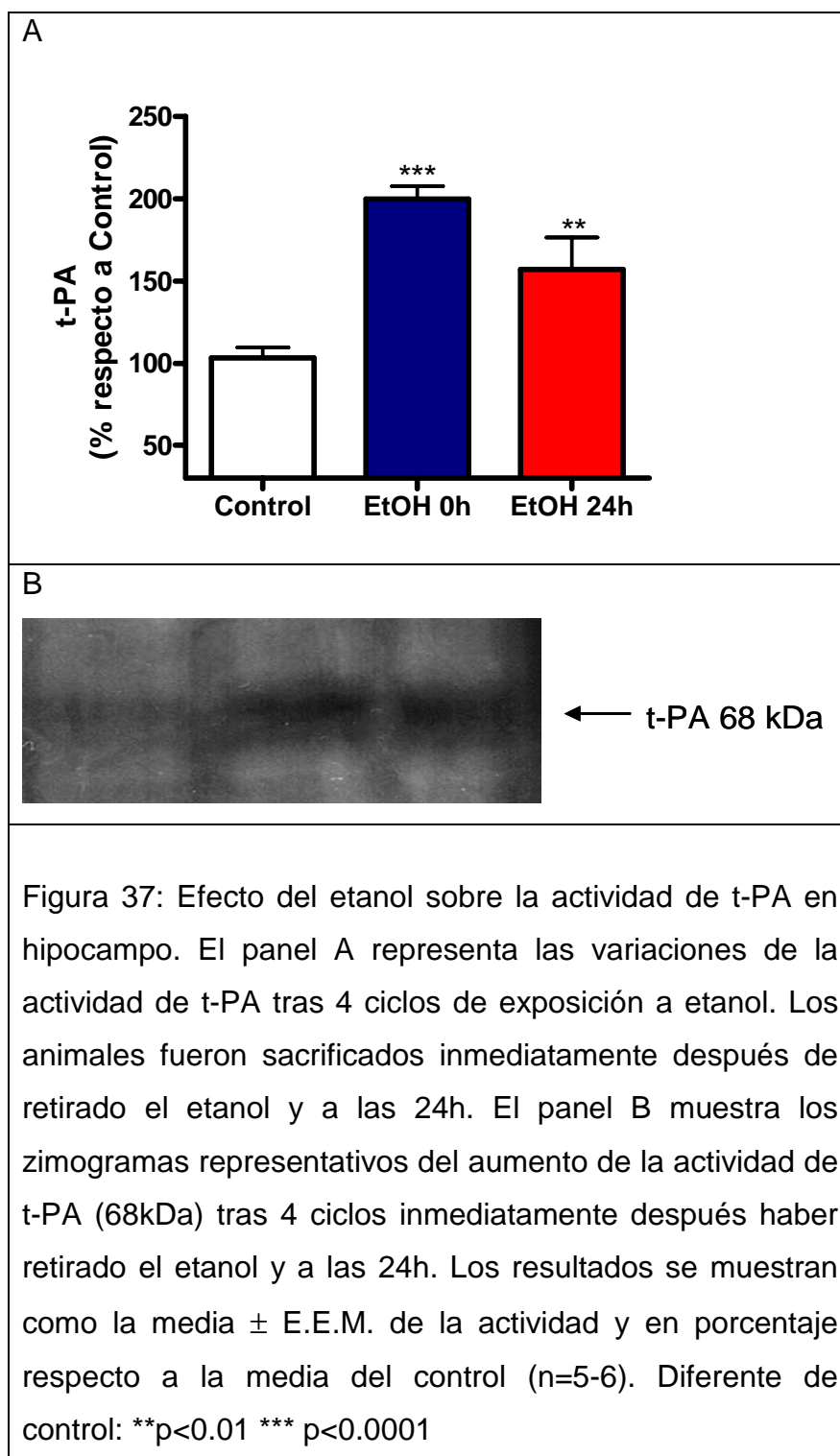
El activador tisular del plasminógeno (en inglés: *Tissue Plasminogen Activator* o t-PA) es una serín proteasa expresada principalmente por las células de la unión neurovascular (Ortolano y Spuch, 2013), que actúa transformando el plasminógeno en plasmina. La plasmina puede digerir la lamina basal por sí misma o bien puede activar algunas de las pro-MMPs como la pro-MMP3 (Salo et al., 2008).

Dado el aumento de la actividad enzimática de MMP-3 se procedió a analizar los niveles de expresión y de activación enzimática de t-PA en hipocampo de ratón. Con respecto a la expresión, el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de t-PA (68kDa; $F_{2,20}=18.37$; $p<0.0001$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de t-PA inmediatamente después de finalizar el consumo (51.2%) y a las 24h (41.8%; figura 36).



Con respecto a la actividad enzimática, el ANOVA de una vía reveló que la exposición a 4 ciclos de etanol genera un efecto significativo en la actividad de t-PA ($F_{2,20}=12.33$;

$p=0.0004$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la actividad de t-PA inmediatamente después de finalizar el consumo (93.7%) y a las 24h (52.2%; figura 37).



12. Efecto del etanol sobre la muerte neuronal

El etanol induce muerte neuronal tras administración aguda y crónica. Es posible analizar esta muerte neuronal mediante técnicas de inmunohistoquímica que utilizan marcadores como el Fluoro-Jade, un fluorocromo que proporciona un marcaje específico de muerte neuronal (Schmued et al., 1997). En base a esto, se investigó el efecto de la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la muerte neuronal en el giro dentado inmediatamente después de retirado (0h) el etanol y 24h más tarde. El ANOVA de una vía revela que la administración de etanol induce cambios significativos sobre la inmunorreactividad de Fluoro-Jade en giro dentado ($F_{2,25}=17.85$, $p=0.0001$). El análisis post-hoc indica un incremento de la muerte neuronal inmediatamente después haber retirado el etanol (113.8%) y 24h más tarde (164.4%; figura 38).

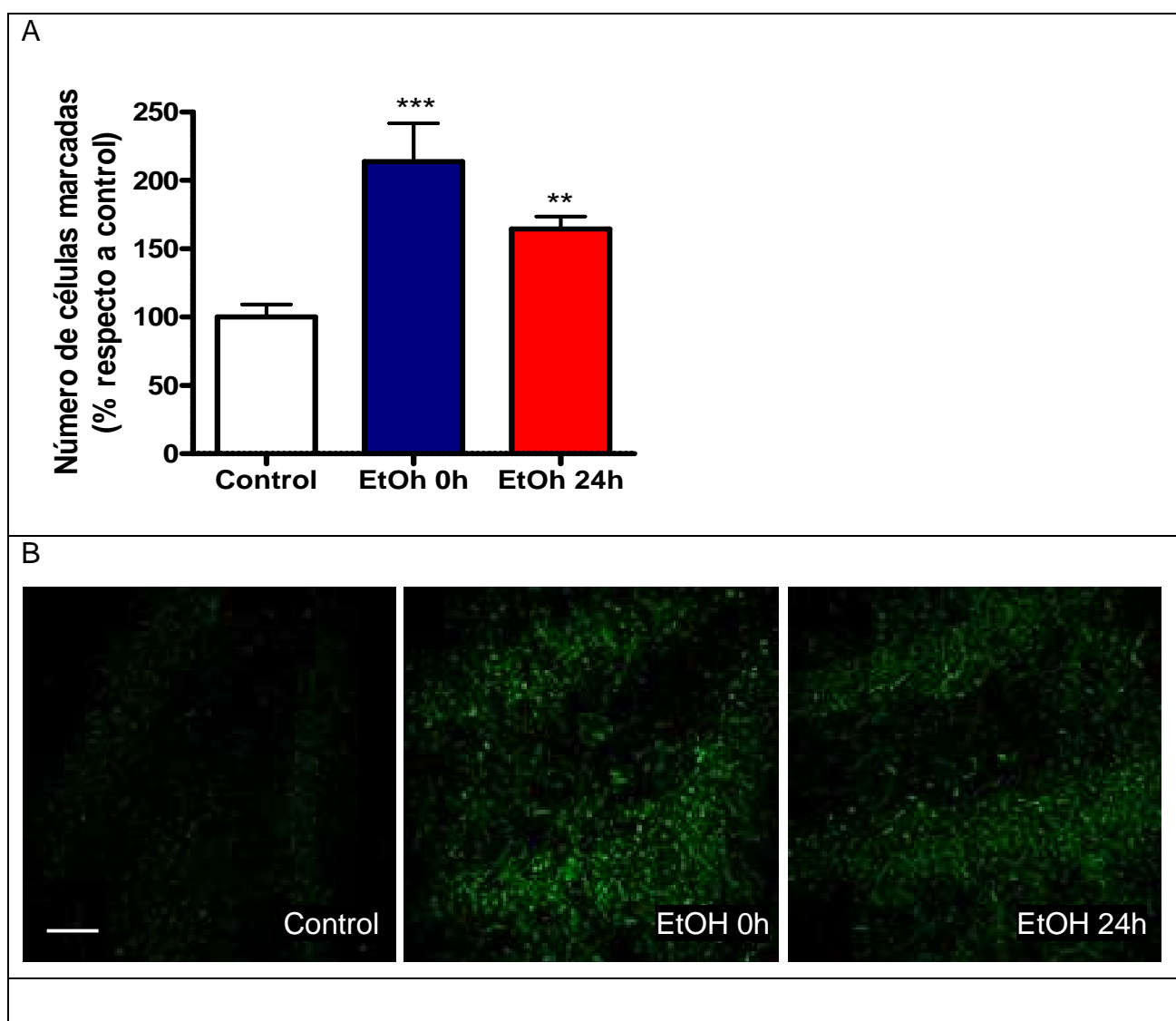


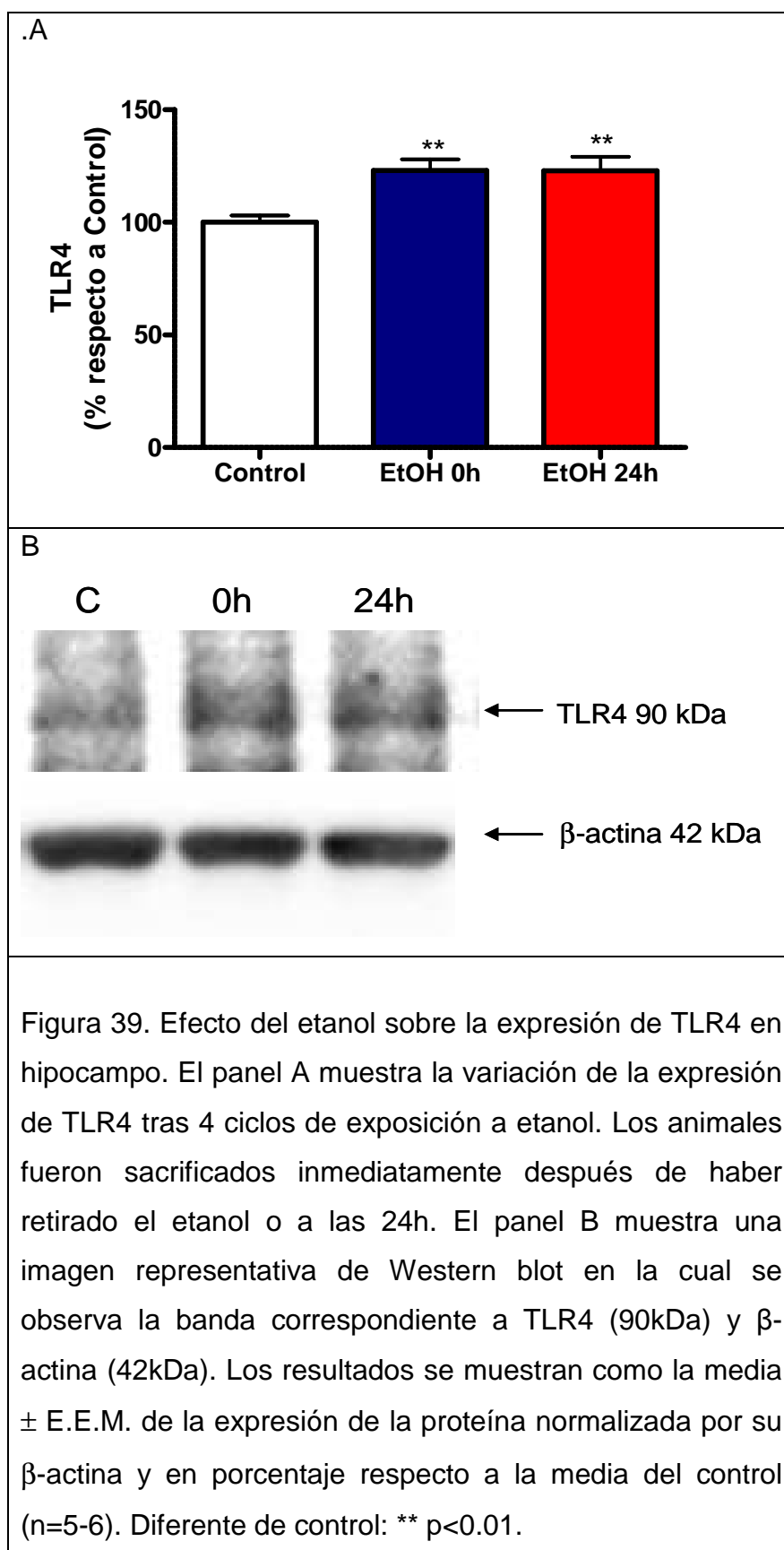
Figura 38: Efecto del consumo de etanol sobre la muerte neuronal en el giro dentado. El panel A representa las variaciones en la muerte neuronal tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y 24h más tarde. El panel B muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento del marcaje de células marcadas positivamente en ratones que han consumido etanol tras 4 ciclos. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. del número de células positivas en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: **p<0.01; *** p<0.001.

13. Estudio de la señalización de TLR4

13.1 Efecto de etanol sobre expresión de TLR4.

Se ha demostrado que el etanol induce neuroinflamación (Sripathirathan et al., 2009; Quin et al., 2008) y que este efecto está mediado entre otros mecanismos por la activación del receptor *toll-like* 4 (TLR4) (Mousas et al., 2009; Blanco y Guerri, 2007; Valles et al., 2004; Fernandez-Lizarbe et al., 2009; Alfonso-Loeches et al., 2010) en astrocitos (Blanco et al 2006.; Floreani et al, 2010). Considerando que resultados mencionados anteriormente en esta Tesis Doctoral revelan un aumento de activación astrocitaria reflejada por un incremento en la inmunorreactividad de S100B y GFAP, pareció razonable analizar la expresión de TLR4 en animales expuestos a 4 ciclos de etanol y sacrificados inmediatamente después de retirar el etanol y 24h más tarde.

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de TLR4 ($F_{2,23}=10.58$, $p=0.0007$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de TLR4 inmediatamente después de finalizar el consumo (23%) y a las 24h (22.9%; figura 39).



13.2 Efecto del etanol sobre la expresión de HMGB1

La proteína del grupo de alta movilidad box1 (HMGB1) se une a TLR4 (Sha Y, 2008; Park JS, 2006; Yang H, 2010) y este complejo permite la unión de proteínas adaptadoras (entre ellas Myd88) que conduce a la iniciación de cascadas de señalización intracelular y a la transducción de señales. En último lugar, estas cascadas inducen la activación de MAPK y la translocación de NF- κ B al núcleo y por lo tanto la producción de citoquinas y otras moléculas inflamatorias (Bianchi, 2009; Hreggvidsdóttir, 2012). Teniendo en cuenta el aumento, en animales que han consumido etanol, de la expresión de TLR4 y para estudiar un posible aumento en la activación del receptor, se analizó la expresión de HMGB1. El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de HMGB1 ($F_{2,21}=7.511$, $p=0.0035$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de HMGB1 inmediatamente después de finalizar el consumo (23.4%) y a las 24h (24.2%; figura 40).

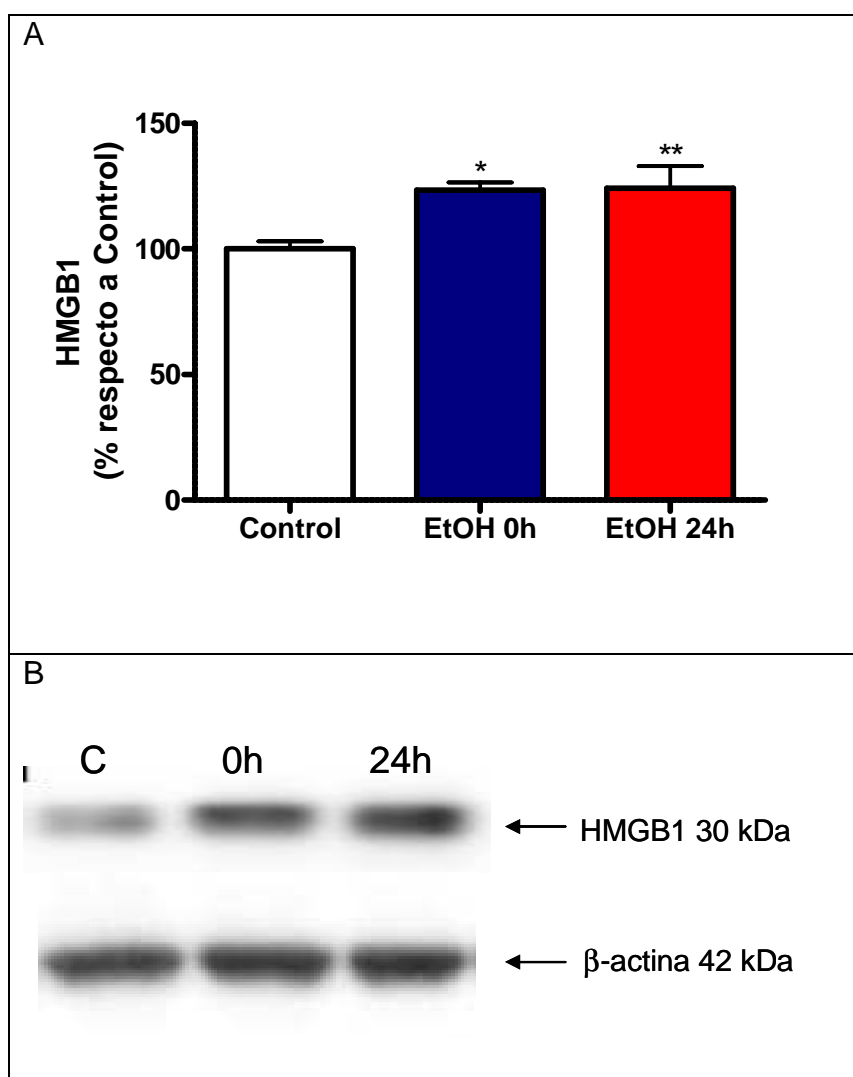
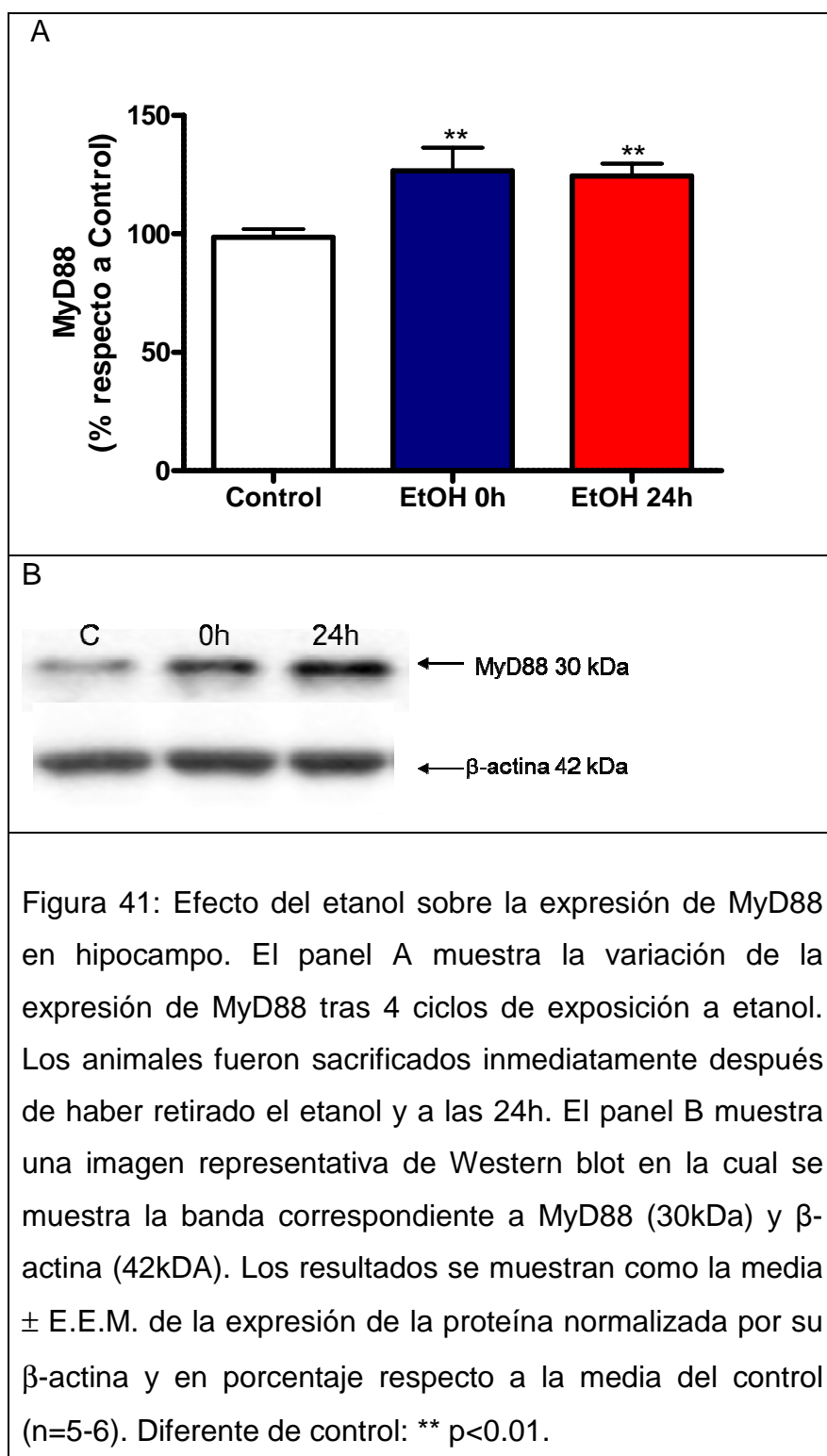


Figura 40: Efecto del etanol sobre la expresión de HMGB1 en hipocampo. El panel A muestra la variación de la expresión de HMGB1 tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. El panel B muestra una imagen representativa de Western blot en la cual se muestra la banda correspondiente a HMGB1 (30kDa) y β -actina (42kDa). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su β -actina y en porcentaje respecto a la media del control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

13.3 Efecto de etanol sobre la expresión de MyD88

La activación de los receptores *toll-like* conduce a una señalización intracelular que se inicia con el reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR (O'Neill, 2003; Akira y Takeda, 2004b) entre las que se encuentra MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88). A esta vía de señalización se le denomina MyD88-dependiente. Atendiendo a las diferencias obtenidas en la expresión del receptor TLR4 se estudió la expresión de MyD88 en animales expuestos a 4 ciclos de etanol y sacrificados inmediatamente después de haber retirado el etanol o a las 24h.

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de MyD88 ($F_{2,24}=9.189$, $p=0.0011$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de MyD88 inmediatamente después de finalizar el consumo (26.5%) y a las 24h (24.4%; figura 41).

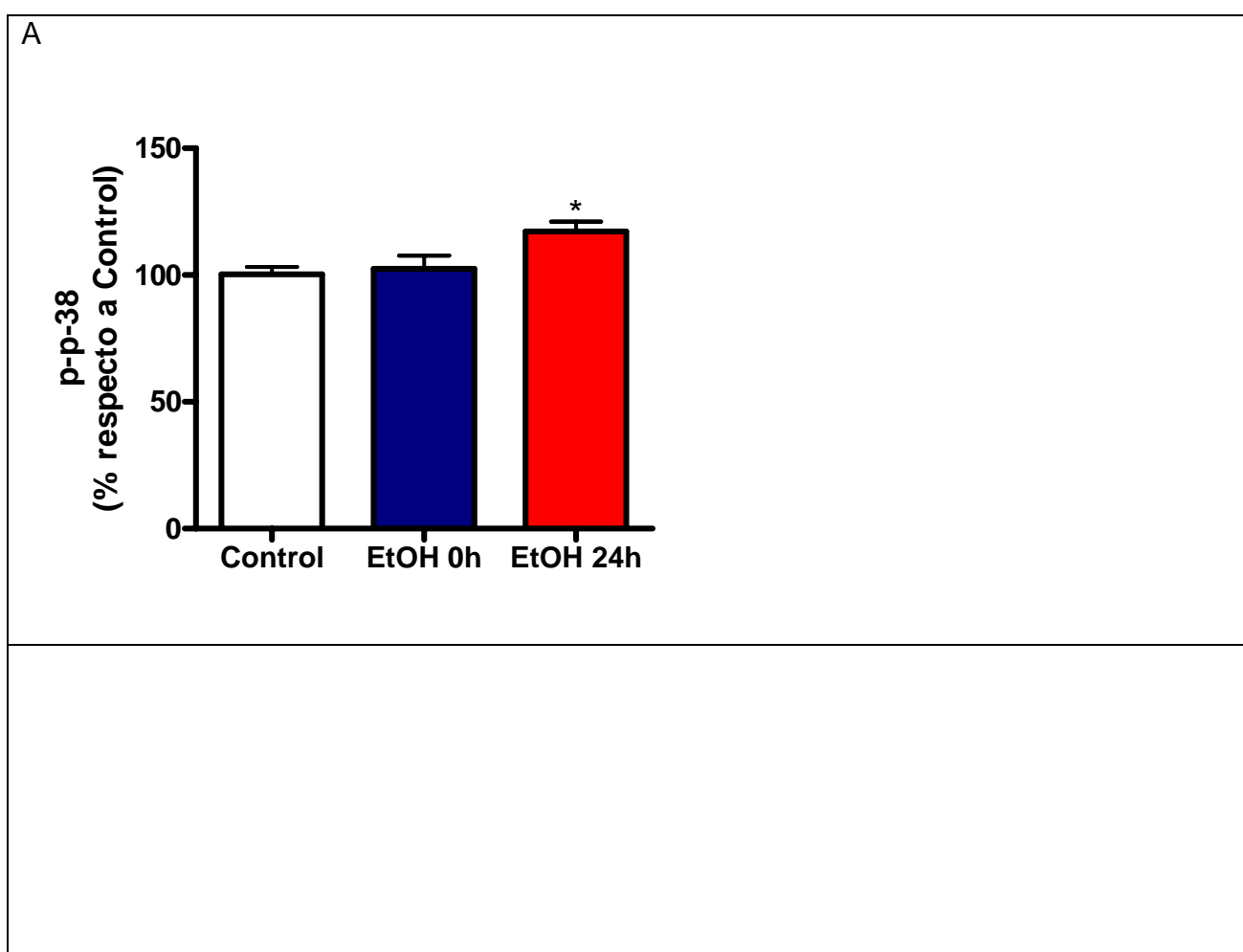


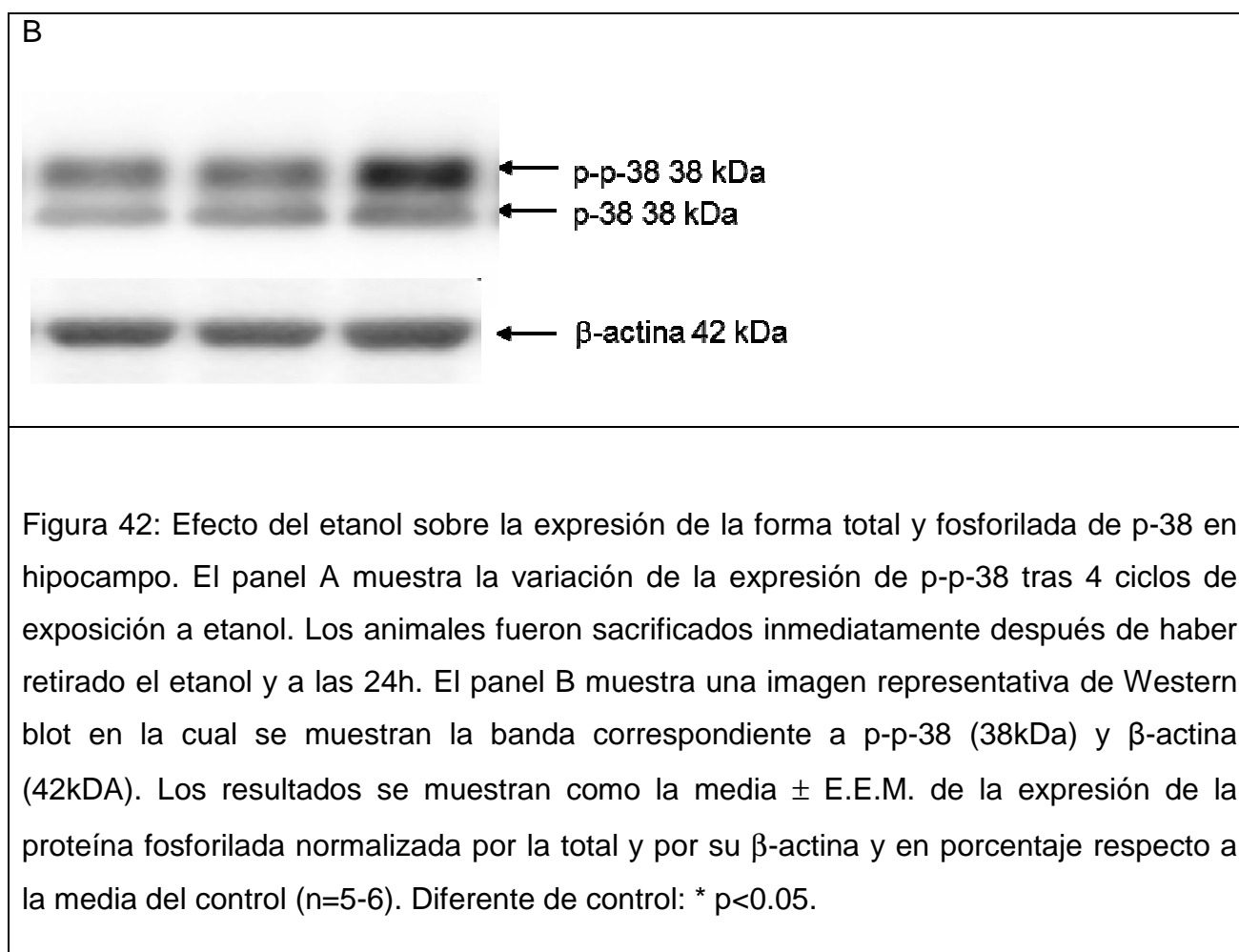
13.4 Efecto del etanol sobre la expresión de las MAPK

Dado el efecto del etanol sobre TLR4 y Myd88, y sobre la muerte neuronal, se analizó la expresión de las MAPK que están involucradas en la respuesta al estrés y en la muerte neuronal (Seger y Krebs, 1995; Waskiewicz y Cooper, 1995; Tibbles y Woodgett, 1999; Davis, 2000; Chang y Karin, 2001; Johnson y Lapadat, 2002; Werlen et al., 2003).

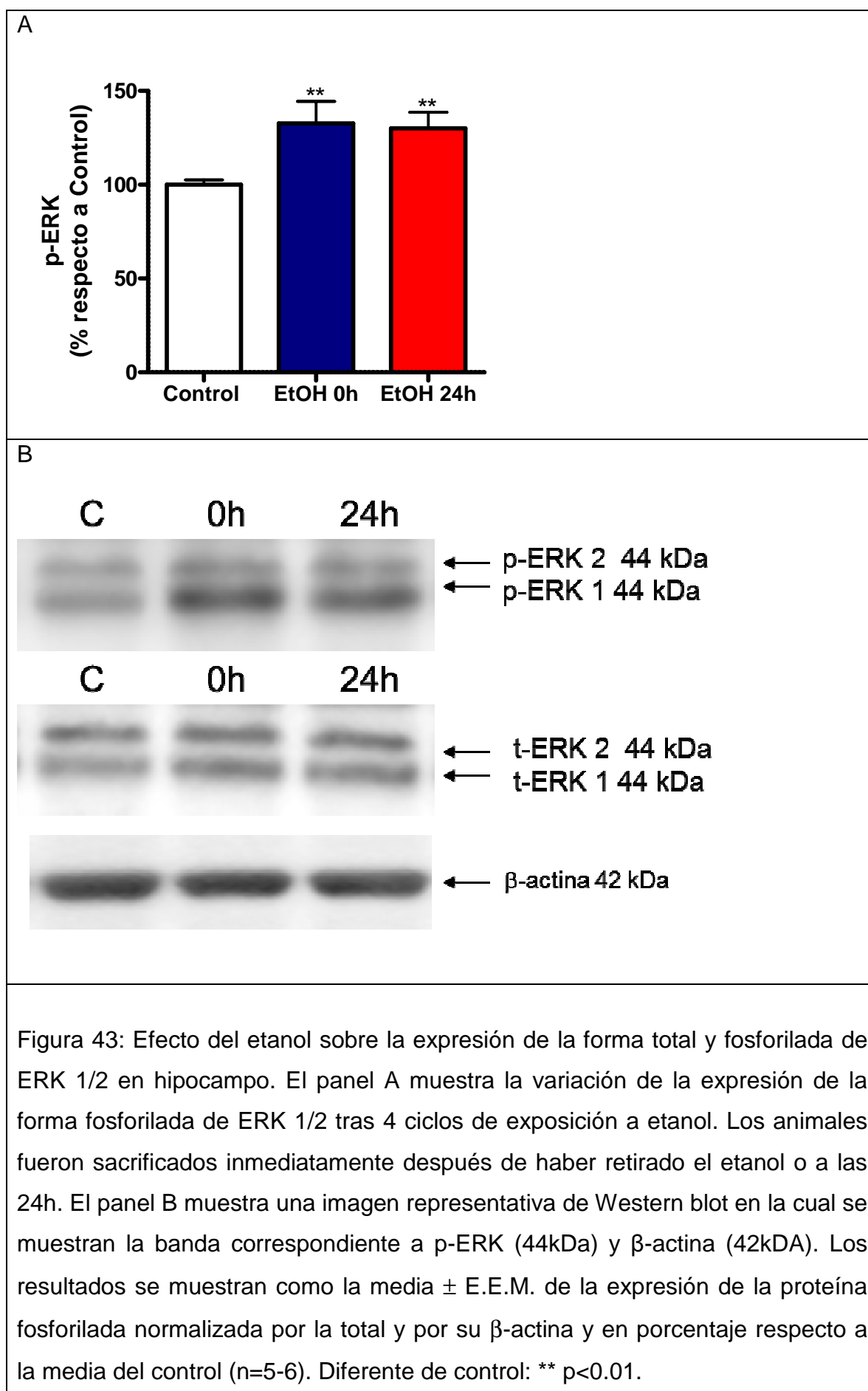
Se estudió la expresión de la forma fosforilada de la proteína JNK, p-JNK. El ANOVA de una vía reveló que no existe ningún efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de la forma fosforilada de p-JNK ($F_{2,22}=0.3427$, $p=0.7136$).

Por otro lado se estudió la expresión de la forma fosforilada de la proteína p-38. El ANOVA de una vía reveló que existe un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la forma fosforilada de p-38 ($F_{2,25}=4.039$, $p=0.0314$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de p-p-38 a las 24h tras haber retirado el etanol (17.2%; figura 42).



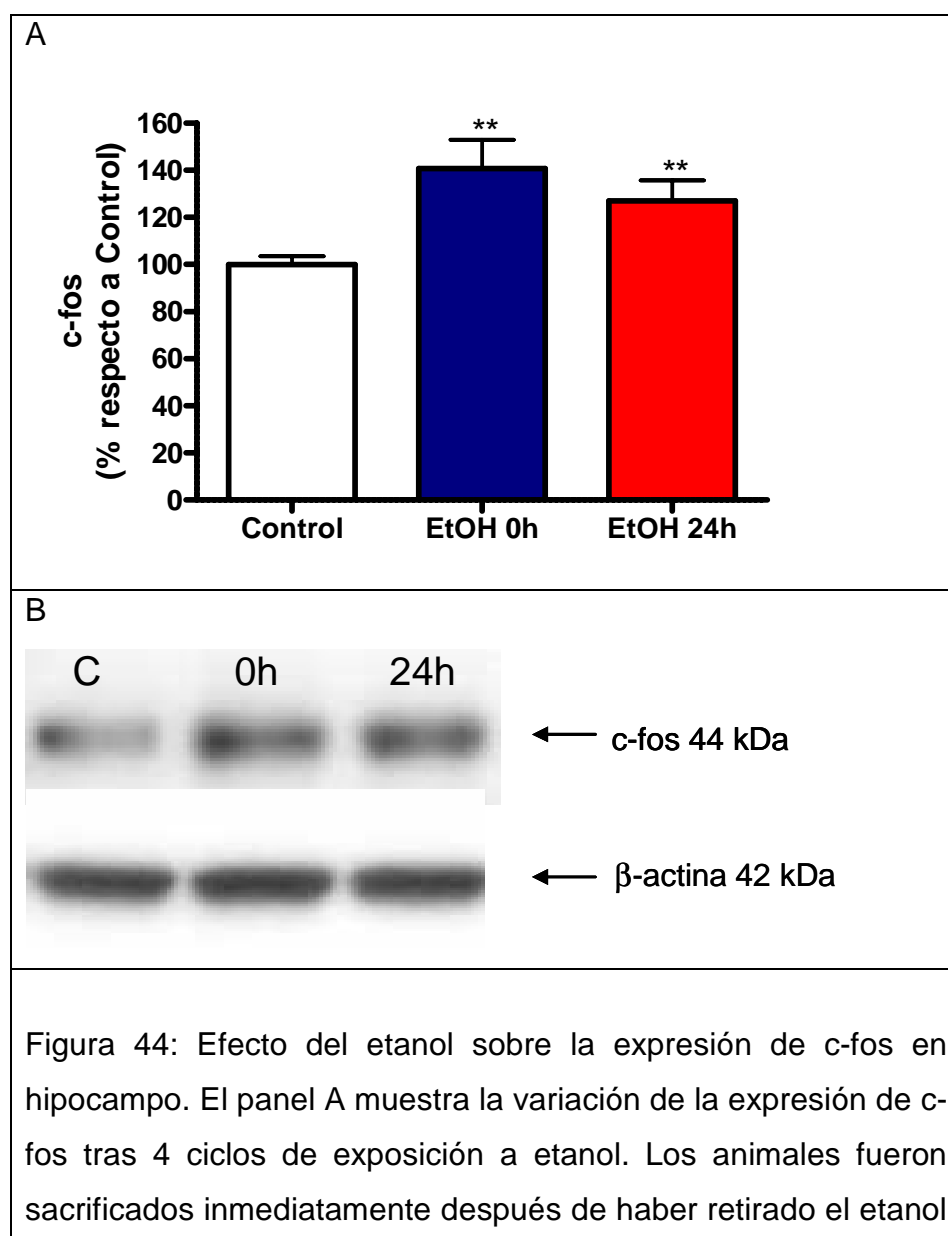


Por último se estudió la expresión de la proteína ERK 1/2. El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de la forma fosforilada de ERK 1/2 ($F_{2,21}=10.62$, $p=0.0007$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de ERK 1/2 inmediatamente después de finalizar el consumo (32.7%) y a las 24h (30.1%; figura 43).



13.5 Efecto del etanol sobre la expresión de la subunidad c-fos de la proteína AP-1

Teniendo en cuenta el aumento de la expresión de la forma fosforilada de ERK, se estudió el efecto del etanol sobre c-fos, subunidad de la proteína AP-1 activada directamente por p-ERK (Angel and Karin, 1991). El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo producido por la exposición a 4 ciclos de etanol sobre la expresión de c-fos ($F_{2,24}=9.777$, $p=0.0009$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un aumento en la expresión de la subunidad c-fos inmediatamente después de finalizar el consumo (40.7%) y a las 24h (26.9%; figura 44).



o a las 24h El panel B muestra una imagen representativa de Western blot en la cual se muestra la banda correspondiente a c-fos (44kDa) y β -actina (42kDa). Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. de la expresión de la proteína normalizada por su β -actina y en porcentaje respecto a la media del control (n=5-6). Diferente de Control: ** $p < 0.01$.

14. Efecto de etanol en ratones TLR4 *Knockout*

En base a los cambios observados en la expresión del TLR4 y en sus mediadores tras la exposición a 4 ciclos de etanol, se utilizaron animales TLR4 *Knockout* (TLR4-KO) para estudiar la implicación de la señalización TLR4 en los cambios que induce el etanol en la glía y en la estructura y permeabilidad de la BHE. En este estudio los animales utilizados fueron expuestos a etanol durante 4 ciclos y se sacrificaron 24h después de retirar el alcohol el 4º día del último ciclo.

14.1 Consumo de etanol en ratones TLR4-KO

En la figura 45 se muestran las cantidades de etanol consumidas por los animales durante los 4 ciclos de consumo. El análisis cuantitativo mediante ANOVA de dos vías indica que en el primer ciclo de consumo existen diferencias significativas producidas por la mutación ($F_{1,31}=8.123$, $p=0.0077$) y por el día de tratamiento ($F_{3,31}=109.7$, $p < 0.0001$) pero no hay interacción ($F_{3,31}=1.671$, $p=0.1935$) entre ambos factores. El análisis post-hoc indica que no existen diferencias entre el etanol consumido por los animales *WT* comparados con los animales TLR4-KO en ninguno de los días de exposición. Además, el análisis post-hoc revela que, como es de esperar debido a la duración de exposición, los animales *WT* y TLR4-KO bebieron significativamente más etanol el 4º día comparado con los tres primeros días (en g/kg, 1º día: 2.40 ± 0.17 , 2º día: 2.22 ± 0.41 , 3º día: 1.58 ± 0.20 , 4º día: 6.65 ± 0.59 en ratones *WT*; 1º día: 2.89 ± 0.24 , 2º día: 2.12 ± 0.27 , 3º día: 2.67 ± 0.22 , 4º día: 7.80 ± 0.28 en ratones TLR4-KO). En el segundo ciclo de consumo el ANOVA de dos vías indica que existen diferencias significativas producidas por la mutación ($F_{1,29}=10.70$, $p=0.0028$) y por el día de tratamiento ($F_{3,29}=45.83$, $p < 0.0001$) pero no hay interacción ($F_{3,29}=1.022$, $p=0.3972$) entre ambos factores. El análisis post-hoc indica que en ninguno de los días de

exposición a etanol existen diferencias entre el etanol consumido por los animales *WT* comparados con los animales *TLR4-KO*. Además, el análisis post-hoc revela que, como es de esperar debido a la duración de exposición, los animales *WT* y *TLR4-KO* bebieron significativamente más etanol el 4^o día comparado con los tres primeros días (en g/kg, 1^{er} día: 1.48 ± 0.11 , 2^o día: 1.51 ± 0.32 , 3^{er} día: 2.13 ± 0.42 , 4^o día: 5.52 ± 0.51 en ratones *WT*; 1^{er} día: 2.76 ± 0.01 , 2^o día: 2.91 ± 0.29 , 3^{er} día: 2.19 ± 0.51 , 4^o día: 6.79 ± 0.59 en ratones *TLR4-KO*). De forma similar a los ciclos anteriores en el tercer ciclo de consumo el análisis cuantitativo mediante ANOVA de dos vías indica que no existen diferencias significativas producidas por la mutación ($F_{1,30}=0.0168$, $p=0.897$), pero sí por el día de tratamiento ($F_{3,30}=26.36$, $p<0.0001$) aunque no se observa interacción ($F_{3,30}=1.054$, $p=0.3831$) entre ambos factores. El análisis post-hoc indica que no existen diferencias entre el etanol consumido por los animales *WT* comparados con los animales *TLR4-KO* en ninguno de los días de exposición a etanol. Además, el análisis post-hoc revela que, como es de esperar debido a la duración de exposición, los animales *WT* y *TLR4-KO* bebieron significativamente más etanol el 4^o día comparado con los tres primeros días (en g/kg, 1^{er} día: 3.75 ± 0.11 , 2^o día: 3.29 ± 0.14 , 3^{er} día: 2.66 ± 0.48 , 4^o día: 5.75 ± 0.41 en ratones *WT*; 1^{er} día: 2.98 ± 0.86 , 2^o día: 3.35 ± 0.29 , 3^{er} día: 3.24 ± 0.47 , 4^o día: 6.01 ± 0.38 en ratones *TLR4-KO*). Por último el ANOVA de dos vías de nuevo indica que en el cuarto ciclo de consumo no existen diferencias significativas producidas por la mutación ($F_{1,30}=0.2437$, $p=0.6249$), pero sí de tratamiento ($F_{3,30}=24.28$, $p<0.0001$) y no se observa interacción ($F_{3,30}=0.6301$, $p=0.5826$) entre ambos factores. El análisis post-hoc indica que no existen diferencias entre el etanol consumido por los animales *WT* comparados con los animales *TLR4-KO* en ninguno de los días de exposición a etanol. Por otra parte el análisis post-hoc revela que, como es de esperar debido a la duración de exposición, los animales *WT* y *TLR4-KO* bebieron significativamente más etanol el 4^o día comparado con los tres primeros días (en g/kg, 1^{er} día: 1.51 ± 0.29 , 2^o día: 2.59 ± 0.37 , 3^{er} día: 1.77 ± 0.23 , 4^o día: 5.52 ± 0.23 en ratones *WT*; 1^{er} día: 1.84 ± 0.41 , 2^o día: 2.09 ± 0.47 , 3^{er} día: 2.64 ± 0.34 , 4^o día: 5.69 ± 0.74 en ratones *TLR4-KO*).

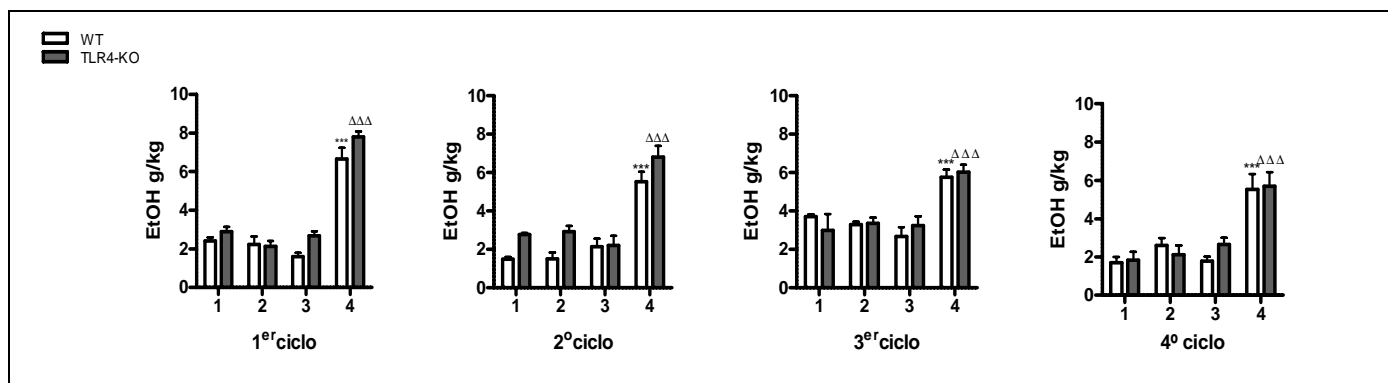


Figura 45: Consumo de etanol en ratones TLR4-KO durante 4 ciclos consecutivos de exposición a etanol. Los datos representan los gramos de etanol, por kilogramos de peso corporal, consumidos por los animales durante las 4 semanas de exposición. Los resultados se muestran como la media \pm E.E.M. Diferente de los tres días anteriores de consumo de etanol en WT: *** $p < 0.0001$; diferente de los tres días anteriores de consumo de etanol en TLR4-KO: $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.0001$.

14.2 Efecto de etanol sobre la activación glial en animales TLR4-KO

14.2.1 Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de GFAP e Iba-1

En los ratones TLR4-KO no se aprecia ningún cambio en la expresión astrogliar con el marcador GFAP, ni microglial con el marcador Iba-1, respecto a la expresión que se observa en los animales WT.

El ANOVA de una vía reveló que no existen variaciones significativas en la inmunorreactividad de GFAP en giro dentado ($F_{3,18}=1.08$, $p=0.3836$), CA1 ($F_{3,18}=1.57$, $p=0.23$) y CA3 ($F_{3,18}=2.36$, $p=0.11$) (Figura 46).

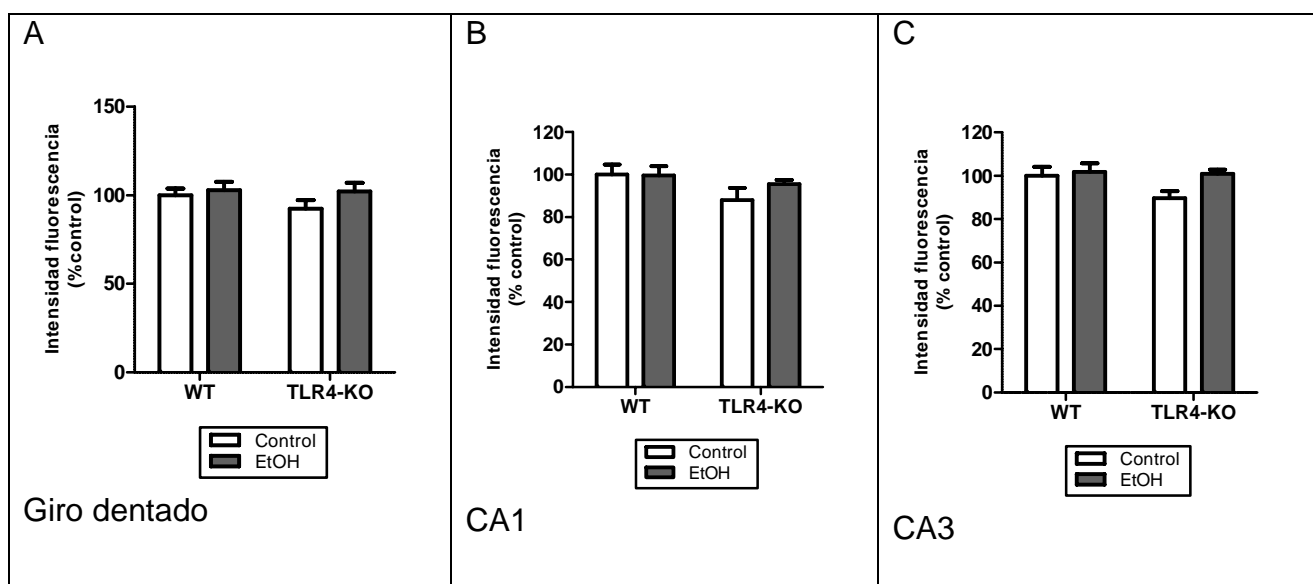


Figura 46: Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de GFAP en hipocampo de animales *WT* y *TLR4-KO*. Las gráficas representan las cuantificaciones de la inmunorreactividad de GFAP en giro dentado (A), CA1 (B), CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control ($n=5-6$).

Respecto a Iba-1 el ANOVA de una vía reveló que no existen variaciones significativas en la inmunorreactividad de Iba-1 en giro dentado ($F_{3,18}=0.11$, $p=0.95$), CA1 ($F_{3,18}=0.22$, $p=0.21$) y CA3 ($F_{3,18}=0.11$, $p=0.55$) (Figura 47).

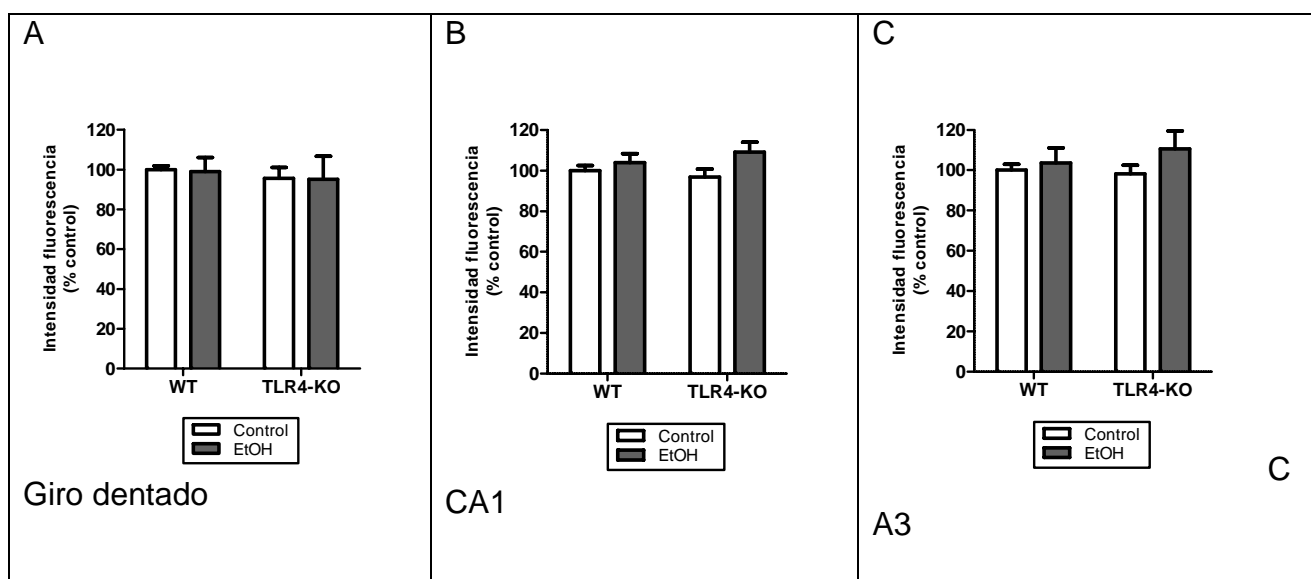


Figura 47: Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de Iba-1 en hipocampo de animales *WT* y *TLR4-KO*. Las gráficas representan las cuantificaciones de la inmunorreactividad de Iba-1 en giro dentado (A), CA1 (B) y CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6).

14.2.2 Efecto de etanol sobre la expresión de S100B

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y *TLR4-KO* en el efecto producido por el consumo de etanol sobre la expresión de S100B en giro dentado ($F_{3,18}=18.38$, $p<0.0001$), CA1 ($F_{3,18}=6.93$, $p=0.0027$) y CA3 ($F_{3,18}=9.32$, $p=0.0006$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad de S100B en animales *WT* a las 24h de finalizar el consumo (27.1% en giro dentado, 17.1% en CA1 y 24.5% en CA3), efecto que no se observa en los ratones *TLR4-KO* (figura 48).

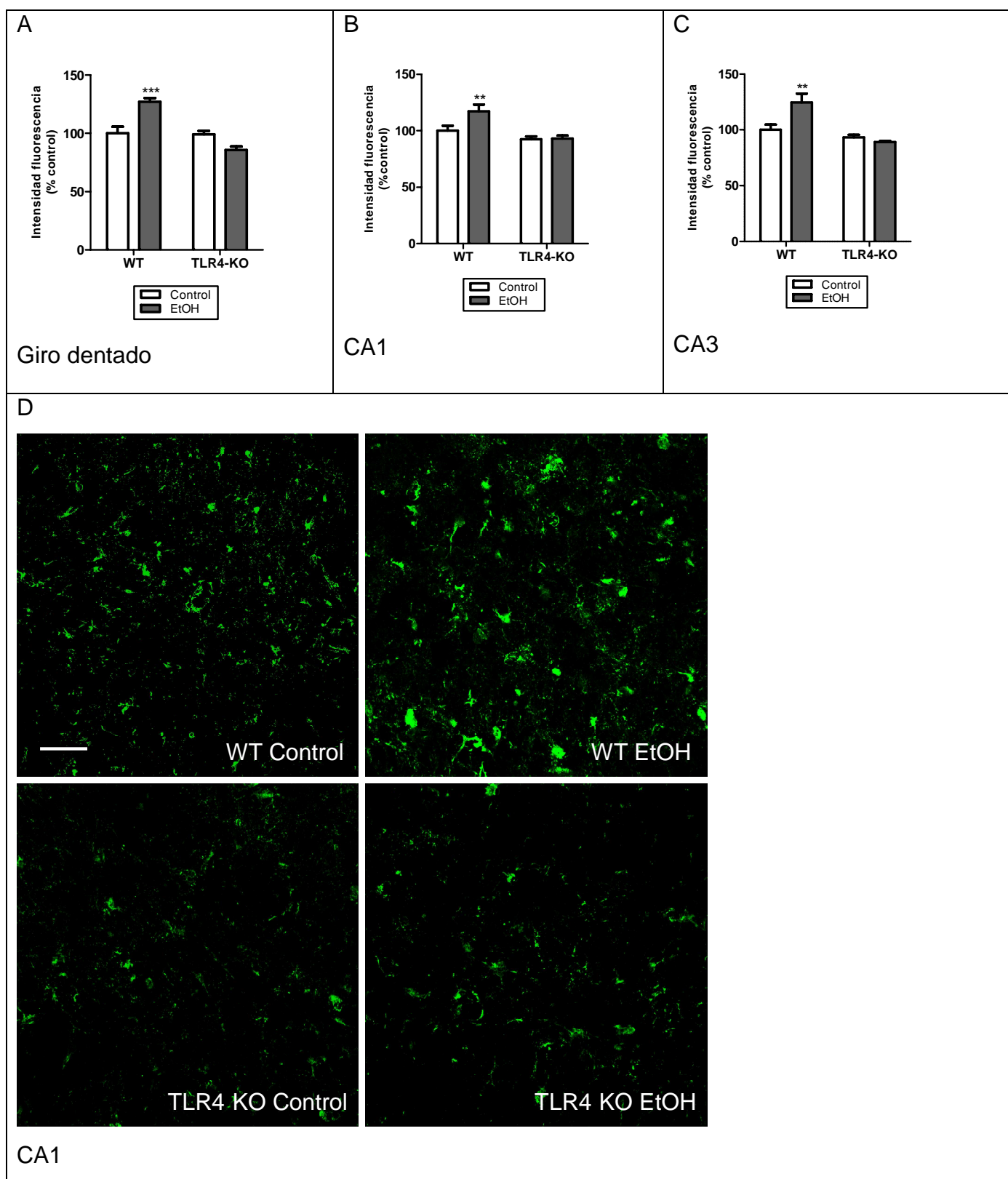


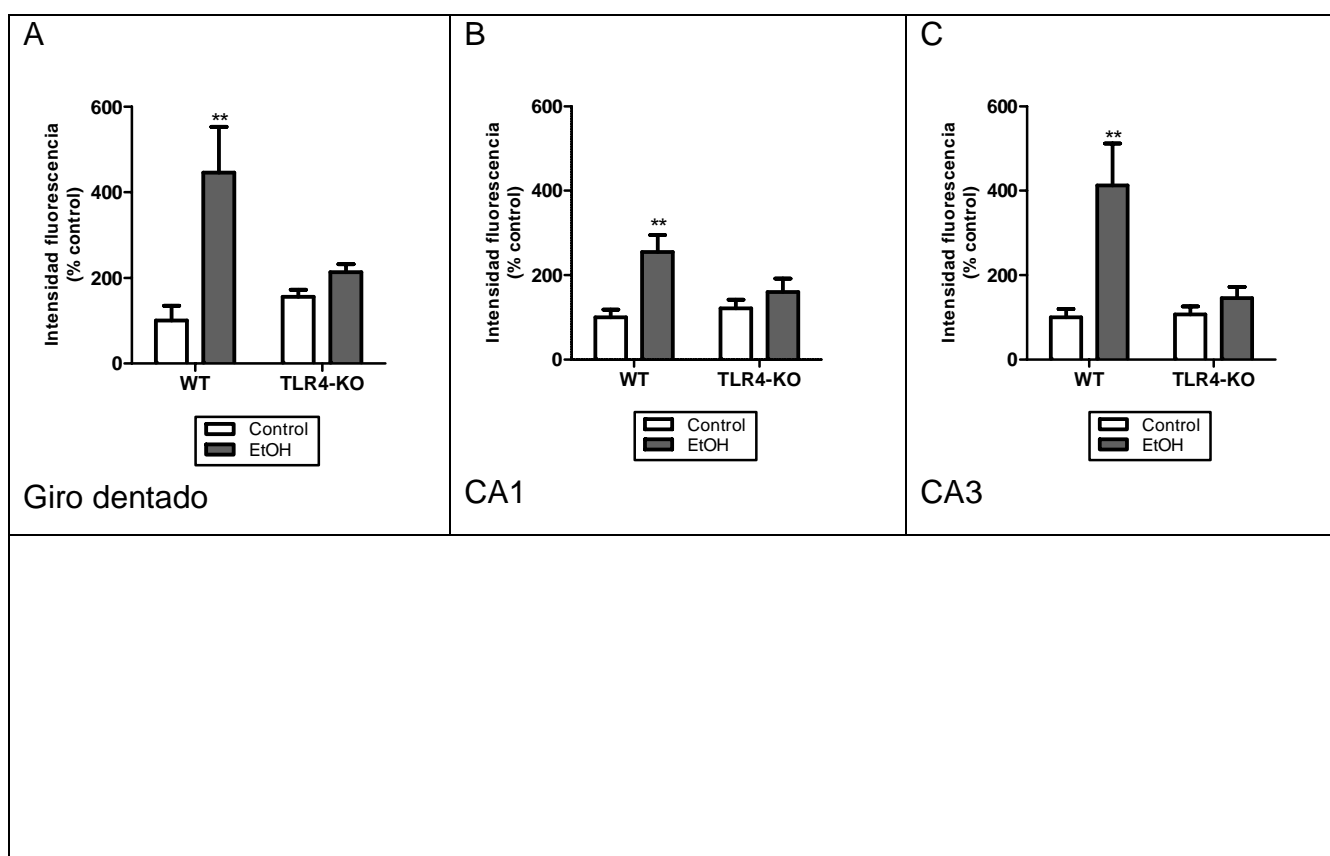
Figura 48: Efecto de etanol sobre la inmunorreactividad de S100B en hipocampo de animales WT y TLR4-KO. Las gráficas representan las cuantificaciones de la inmunorreactividad de S100B en giro dentado (A), CA1 (B), y CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. El panel D muestra imágenes de

inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en la inmunorreactividad de S00B en la zona CA1 de los animales *WT*, efecto que no se observa en los animales *TLR4-KO*. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

14.3 Efecto de etanol sobre la extravasación de IgG y la expresión de laminina y colágeno IV en hipocampo de ratones *TLR4-KO*

14.3.1 Efecto de etanol sobre la extravasación de IgG en el hipocampo de ratones en animales *TLR4-KO*

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y *TLR4-KO* en relación con el efecto producido por el etanol sobre la de inmunorreactividad de IgG en giro dentado ($F_{3,18}=6.31$, $p=0.0041$), CA1 ($F_{3,16}=3.11$, $p=0.0559$) y CA3 ($F_{3,15}=7.46$, $p=0.0028$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la inmunorreactividad de IgG en animales *WT* a las 24h de finalizar el consumo (346.4% en giro dentado, 142.6% en CA1 y 312.6% en CA3), efecto que no se observa en los ratones *TLR4-KO* (figura 49).



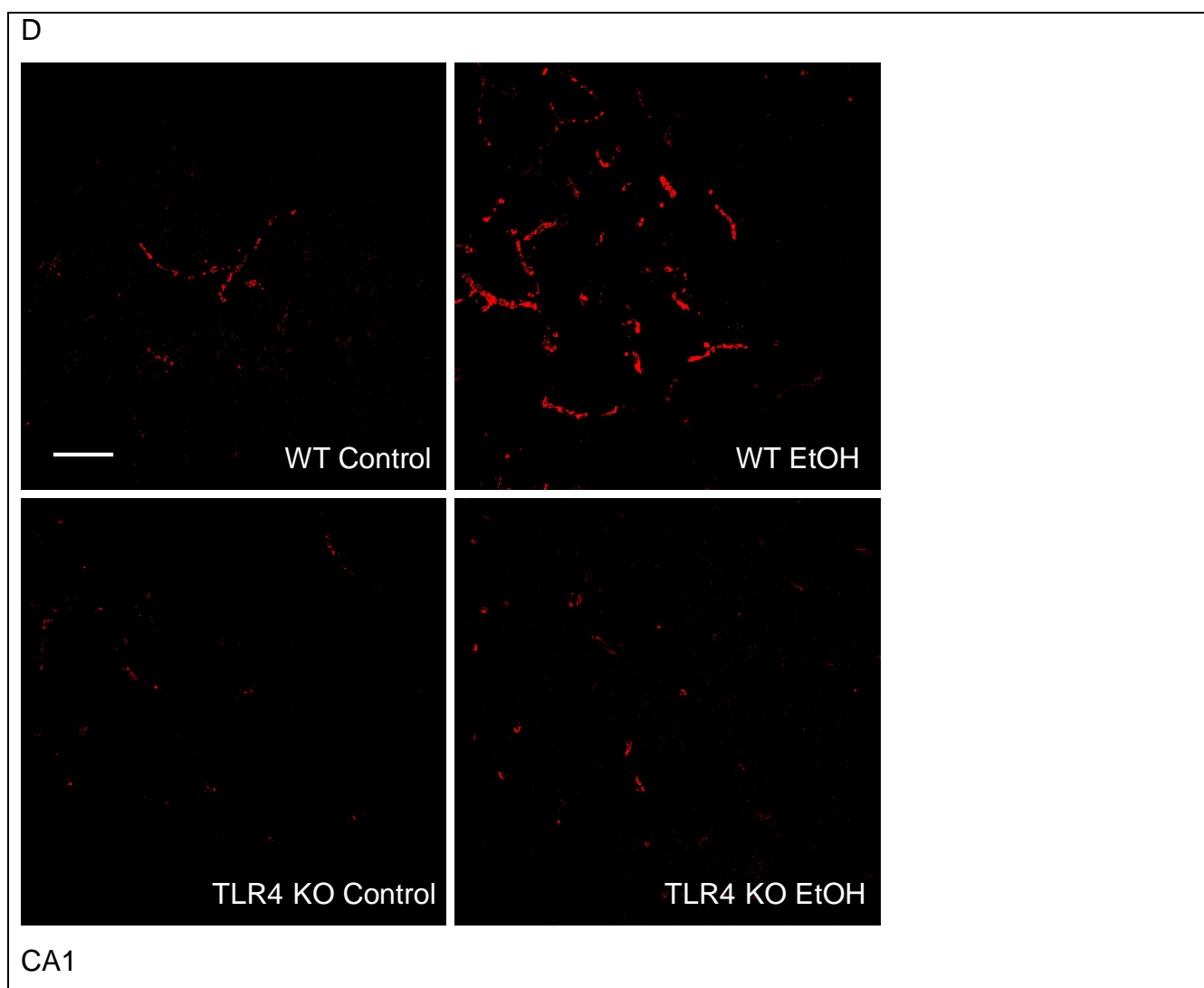


Figura 49. Efecto de etanol sobre la extravasación de IgG en hipocampo de animales *WT* y *TLR4-KO*. Las gráficas representan las variaciones de IgG en giro dentado (A), CA1 (B), y CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. El panel D muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en la inmunorreactividad de IgG en la zona CA1 de los animales *WT* y de la ausencia de efecto en los animales *TLR4-KO*. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=6). Diferente de control: ** $p < 0.01$.

14.3.2 Expresión de laminina en animales *TLR4-KO*

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y *TLR4-KO* en relación con el efecto producido por el etanol sobre la expresión de laminina en CA1 ($F_{3,16}=4.845$, $p=0.0139$) y CA3 ($F_{3,18}=4.059$, $p=0.0229$) sin observar ninguna variación en el giro

dentado ($F_{3,18}=1.22$, $p=0.3311$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una disminución en la inmunorreactividad de laminina en animales *WT* a las 24h después de finalizar el consumo (29.3% en CA1 y 41.7% en CA3), efecto que no se observa en los ratones *TLR4-KO* (figura 50).

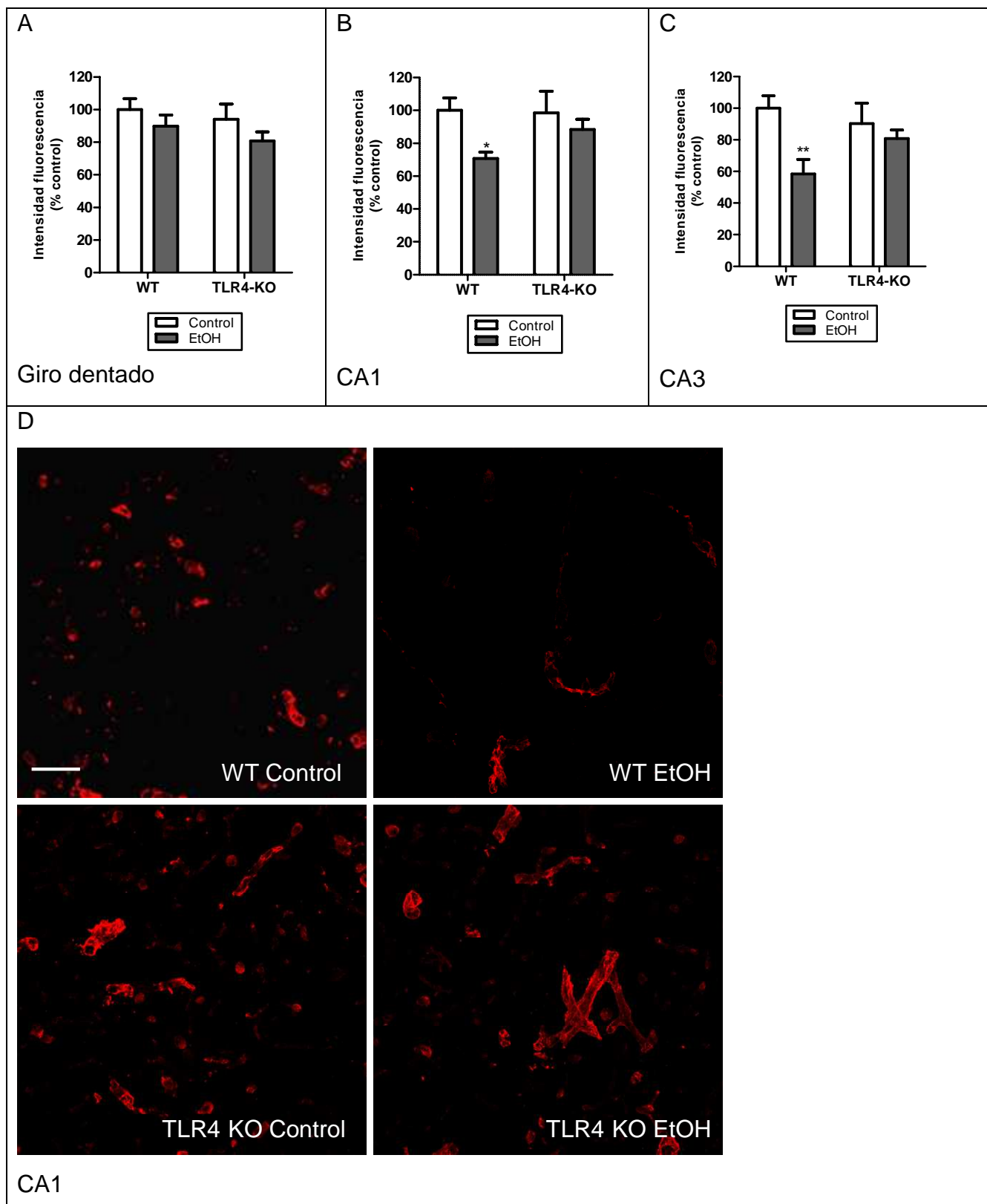
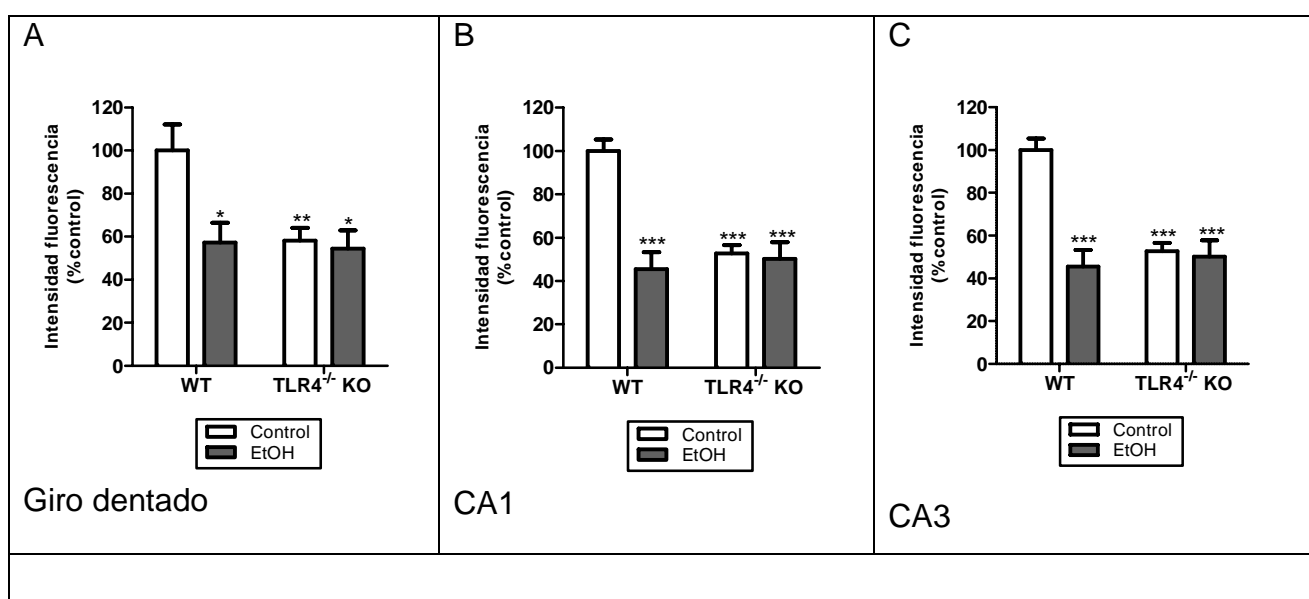


Figura 50: Efecto de etanol sobre la expresión de laminina en hipocampo de animales *WT* y *TLR4-KO*. Las gráficas representan las variaciones de laminina en giro dentado (A), CA1 (B), y CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. La figura (D) muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas de la disminución en la inmunorreactividad de laminina en los animales *WT* y de la ausencia de efecto en los animales *TLR4-KO* en la zona CA1. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

14.3.3 Expresión de colágeno IV en animales *TLR4-KO*

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y *TLR4-KO* en relación con el efecto producido por el etanol sobre la expresión de colágeno IV y en relación con el efecto producido por la ausencia del gen para el TLR4, en giro dentado ($F_{3,18}=5.414$, $p=0.0078$), CA1 ($F_{3,18}=16.47$, $p < 0.0001$) y CA3 ($F_{3,18}=22.69$, $p < 0.0001$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce una disminución en la inmunorreactividad de colágeno IV en animales *WT* a las 24h después de finalizar el consumo (42.7% en giro dentado, 54.4% en CA1 y 55.3% en CA3), efecto que no se observa en los ratones *TLR4-KO* a las 24h de finalizar el consumo. La ausencia del gen para el receptor TLR4 induce por sí misma una disminución en la inmunorreactividad de colágeno IV (41.9% en giro dentado, 47.3% en CA1, 53.4% en CA3; figura 51).



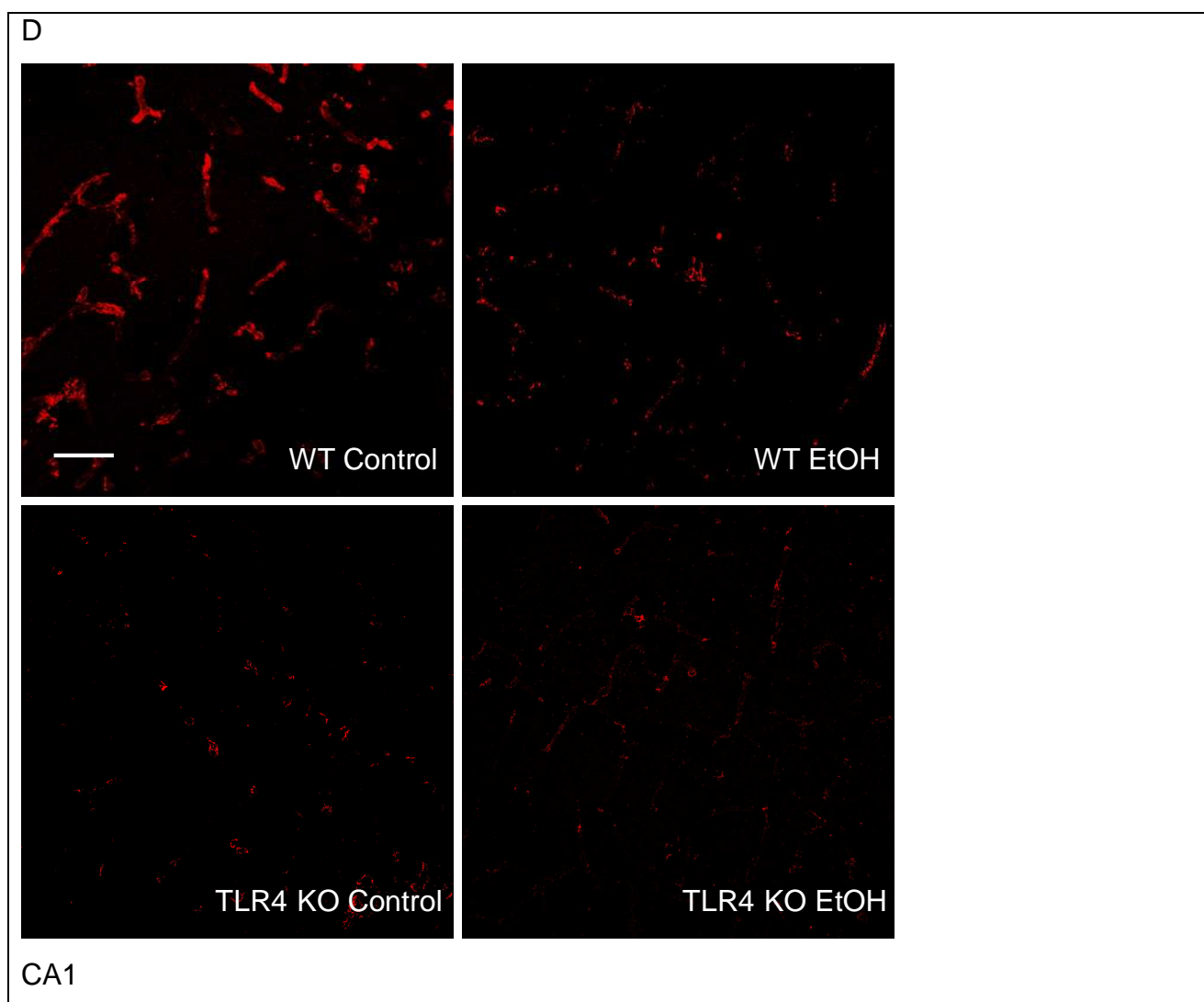
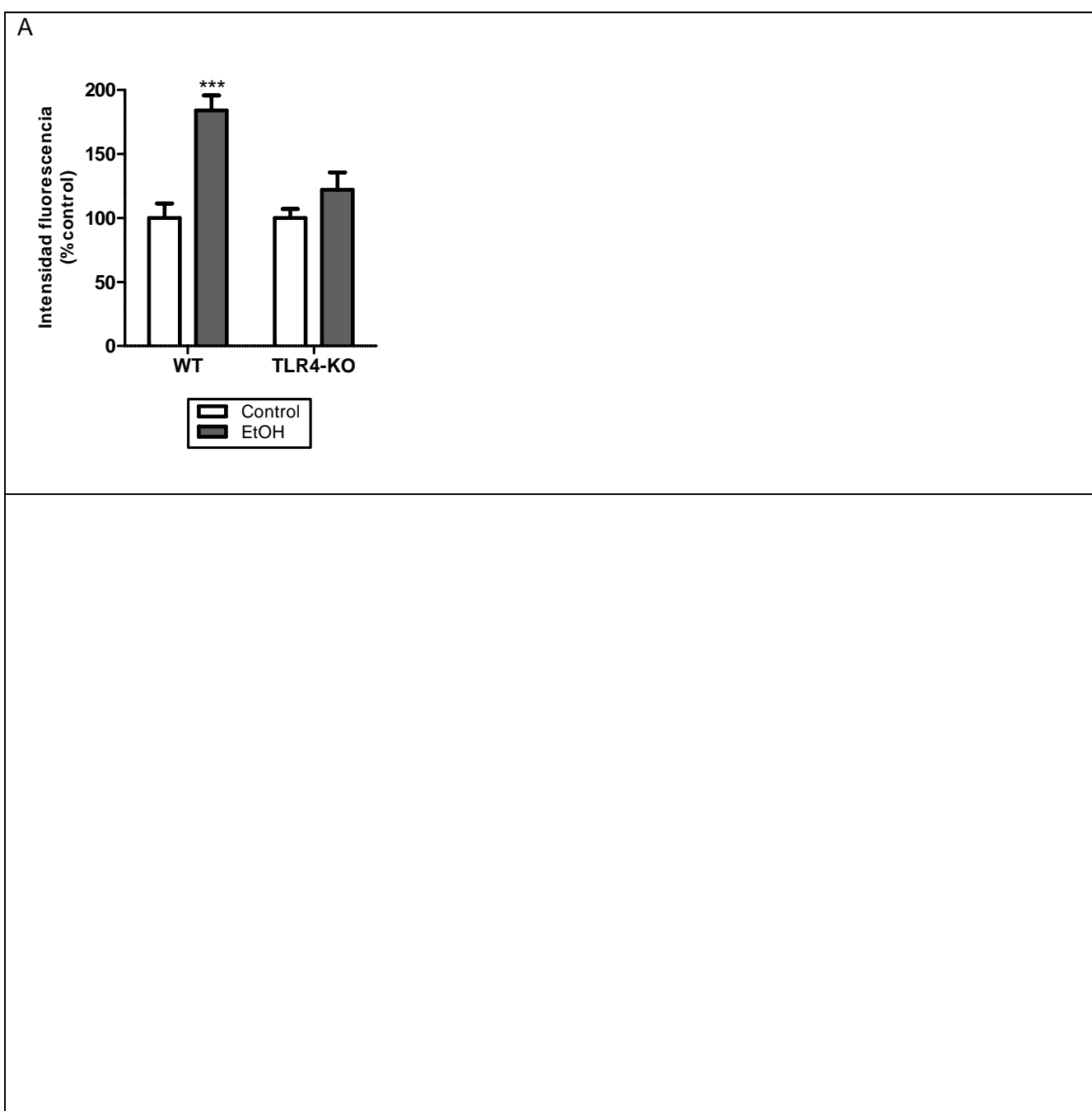


Figura 51: Efecto de etanol sobre la expresión de colágeno IV en hipocampo de animales *WT* y *TLR4-KO*. Las gráficas representan las variaciones de colágeno IV en giro dentado (A), CA1 (B), CA3 (C) tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. La figura (D) muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas de la disminución en la inmunorreactividad de colágeno IV en los animales *WT* y en los dos grupos de animales *TLR4-KO* en la zona CA1. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. de la intensidad integrada de fluorescencia en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

14.4 Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en el hipocampo de ratón en animales TLR4-KO

14.4.1 Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en el giro dentado de ratón TLR4-KO

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y TLR4-KO en relación con el efecto producido por el etanol sobre muerte neuronal en giro dentado ($F_{3,18}=13.21$, $p<0.0001$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la muerte neuronal en animales *WT* a las 24h después de finalizar el consumo en giro dentado (84%), efecto que no se observa en los ratones TLR4-KO (figura 52).



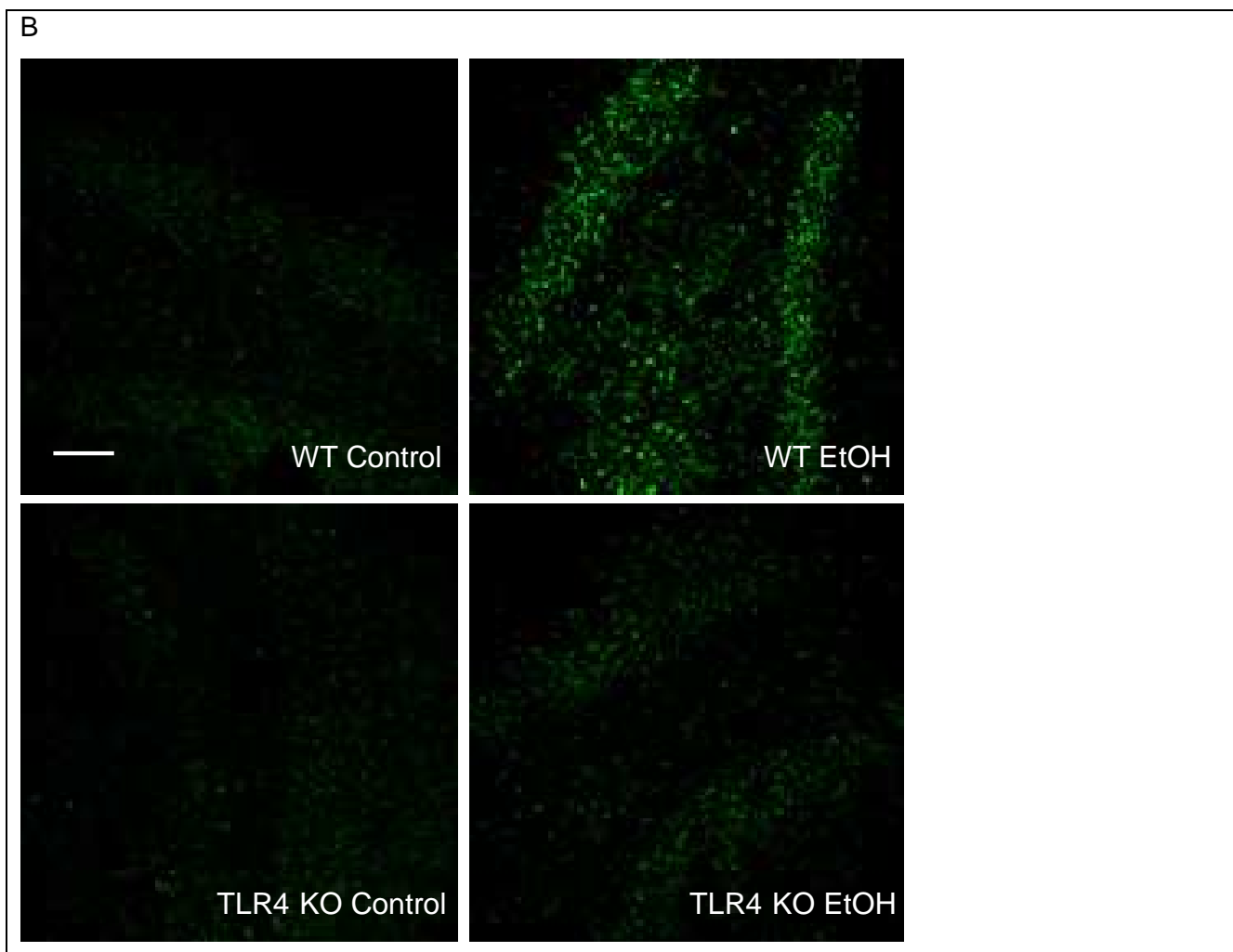
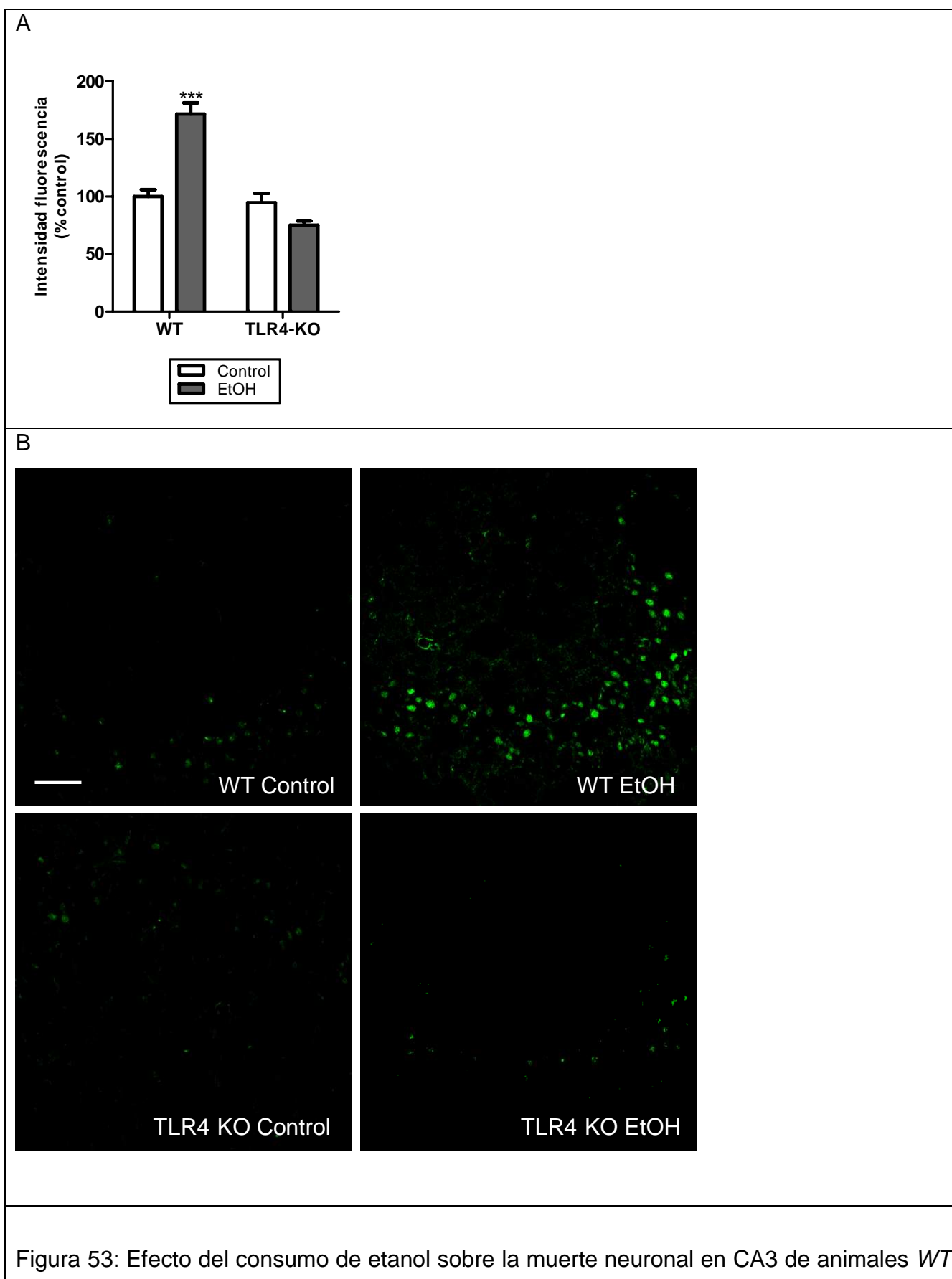


Figura 52: Efecto del consumo de etanol sobre la muerte neuronal en giro dentado de animales *WT* y *TLR4-KO*. El panel A representa las variaciones en la muerte neuronal tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. El panel B muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en el marcaje de células en giro dentado de ratones *WT* y de la ausencia de este aumento en animales *TLR4-KO*. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. del número de células positivas en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: *** $p < 0.001$.

14.4.2 Efecto de etanol sobre la muerte neuronal en CA3 de ratón en *TLR4-KO*

El ANOVA de una vía reveló diferencias entre los ratones *WT* y *TLR4-KO* en relación con el efecto producido por el etanol sobre muerte neuronal en CA3 ($F_{3,18}=32.21$, $p < 0.0001$). El análisis post-hoc indica que el etanol induce un incremento en la muerte neuronal en animales *WT* a las 24h después de finalizar el consumo (71.5%) en CA3, efecto que no se observa en los ratones *TLR4-KO* (figura 53).



y TLR4-KO. El panel A representa las variaciones en la muerte neuronal tras 4 ciclos de exposición a etanol. Los animales fueron sacrificados a las 24h de retirar el consumo. El panel B muestra imágenes de inmunofluorescencia (40x) representativas del aumento en el marcaje de células en CA3 en ratones *WT* y de la ausencia de este aumento en animales TLR4-KO. Los resultados se expresan como la media \pm E.E.M. del número de células positivas en porcentaje respecto a la media del grupo control (n=5-6). Diferente de control: *** $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

El etanol sigue siendo desde hace mucho tiempo la droga más consumida por parte de la población juvenil. Este consumo va aumentando con los años sobre todo en forma de consumo intensivo. El 81.9% de los estudiantes declara haber consumido etanol en el último año (2012) y el 74% en el último mes; y de estos el 62% ha hecho consumo intensivo en el último año (ESTUDES, 2012-2013). De hecho es cada vez más popular entre los adolescentes y los adultos jóvenes el patrón de consumo de alcohol en grandes cantidades concentrado en el fin de semana, en búsqueda de la intoxicación para adaptarse más fácilmente a un grupo de amigos. Este tipo de consumo intensivo es lo que se conoce en la literatura internacional como *binge drinking*. En nuestro estudio se ha utilizado el paradigma *Drinking in the Dark* (DID), protocolo aceptado como modelo de *binge drinking* en roedores (Rhodes et al., 2005). El hecho de que el consumo sea voluntario, evitando así el estrés debido a una administración forzada, y que se alcancen altas concentraciones plasmáticas, hace que se considere que este modelo refleje el consumo de etanol intensivo por parte de adultos jóvenes.

En la presente Tesis Doctoral se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J porque son ratones predispuestos genéticamente al consumo de etanol (Rodgers y McClearn, 1964). Los animales consumieron etanol durante 1 ciclo de DID o durante 4 ciclos de DID. Los primeros 3 días del ciclo se expusieron a etanol durante 2 horas y consumieron entre 2 y 3 g/kg; el 4º día se expusieron a etanol durante 4 horas y consumieron alrededor de 6 g/kg. El consumo, que concuerda con lo que está descrito en otros estudios de DID (Rhodes et al., 2005, Crabbe et al., 2012, Kaur et al., 2012), aumentó de acuerdo con las horas de exposición (Rhodes et al., 2005, Crabbe et al., 2012). Además, las cantidades de etanol consumidas no variaron de manera significativa durante las 4 semanas de exposición. El etanol alcanzó una concentración plasmática que corresponde a la descrita en bibliografía (Lyons et al., 2008), con una media de 135.24 mg/dl el 4º día de exposición. La concentración plasmática de etanol se midió inmediatamente después de haber retirado el etanol considerando que existen evidencias en la literatura indicando que a las 24h de la retirada de etanol ya no se observa concentración de etanol relevante en sangre en ratones C57BL/6J (Dole y Gentry, 1984).

En este protocolo el periodo de exposición a etanol se realiza en ciclo invertido y coincide con el periodo en el que la ingesta de comida es mayor. Por este motivo, en este estudio se determinó la cantidad de comida consumida en gramos referida al peso de los animales. No hubo diferencia en la ingesta de comida entre los animales expuestos a etanol y sus respectivos controles. Estos datos indican que el consumo de alcohol no alteró el patrón de consumo de comida. Además, de acuerdo con la ausencia de diferencias en la ingesta de comida no hubo diferencias en la ganancia de peso entre los animales expuestos a etanol y sus controles a lo largo de las 4 semanas de tratamiento. Está ampliamente descrito en la literatura que la administración de etanol, siguiendo diferentes protocolos y vías de administración puede producir hipotermia (Ritzmann y Tabakoff, 1976a, b, Tabakoff et al., 1976, Kalant y Lê, 1983, Leopold, 1990, Gallego et al., 2012, Damaggio y Gorman, 2014). Este efecto se observa en todas las especies estudiadas de animales de laboratorio, incluyendo gatos, perros, cobayas, ratones, conejos y ratas, cuando los animales son mantenidos a una temperatura ambiente estándar (Kalant y Lê, 1983, Damaggio y Gorman, 2014). La vía de administración no es crítica en la aparición de este efecto ya que se observa la hipotermia inducida por etanol después de administración por vía oral, intraperitoneal (ip), o por inhalación (Ritzmann y Tabakoff, 1976a, b, Tabakoff et al., 1976). Sin embargo se ha descrito que con el protocolo DID no se observa ninguna diferencia significativa en la temperatura el cuarto día de exposición (Ros-Simó et al., 2012). Esto concuerda con los resultados obtenidos utilizando el protocolo DID en esta Tesis Doctoral, durante el cual se midió la temperatura rectal antes del inicio del consumo y después de haber retirado el etanol y no se observó ningún cambio en la temperatura corporal de los animales. Además, algunos estudios han demostrado que en animales adolescentes el efecto de la hipotermia producida por etanol es menor que la observada en animales adultos (Spear, 2000, Brassler y Spear, 2002, Ristuccia y Spear, 2004) y considerando que los animales utilizados en esta Tesis están en la última fase de la adolescencia (adultos jóvenes, 46-59 días de edad, Laviola et al., 2003), este factor podría contribuir a la ausencia de hipotermia. Por otro lado, en este estudio la concentración plasmática es muy baja respecto a otros trabajos donde se ha observado una mantenida disminución de la temperatura corporal con niveles

plasmáticos que alcanzaron 400 mg/dl (Izco et al., 2007) pudiendo ser esta la razón de la ausencia de hipotermia observada.

La BHE controla el transporte de diferentes moléculas manteniendo así la homeostasis del cerebro además de protegerlo mediante la restricción del paso de toxinas a través del endotelio cerebral. Recientes estudios en cultivos de bovino han demostrado que el etanol a una concentración del 23% induce la fosforilación de varias proteínas de las uniones estrechas dando lugar a un aumento en la permeabilidad de la BHE (Haorah et al., 2005a, Haorah et al., 2005b). Entre los factores que han demostrado un papel en los daños en la barrera se encuentran los radicales libres (Haorah et al., 2005a). Datos bibliográficos muestran que el etanol administrado por vía intragástrica a la dosis de 8-11 g/kg por día durante 30 días es capaz de inducir un aumento de la permeabilidad que se manifiesta con aumento del paso de ^{14}C -tirosina, ^{14}C -triptófano y ^{14}C -DOPA (Borisenko, 1990). Sin embargo, los estudios relativos al efecto sobre la permeabilidad de la BHE del consumo intensivo y repetido de etanol en roedores son escasos (Phillips et al., 1997, Elmas et al., 2001).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral consistió en estudiar los efectos producidos por el consumo intensivo y repetido de etanol en ratón, utilizando el modelo *Drinking in the Dark (DID)*, sobre la estructura y permeabilidad de la BHE en el hipocampo. Esta área participa en el desarrollo de procesos cognitivos como memoria y aprendizaje, funciones afectadas por el consumo de etanol. Se han estudiado, cuando ha sido posible, tres zonas del hipocampo (giro dentado, CA1 y CA3) por sus distintas implicaciones en neurogénesis y en diferentes tipos de memoria.

Los resultados muestran que la ingesta de etanol aumenta la extravasación de IgG en los tres subcampos de hipocampo, giro dentado, CA1 y CA3. Este aumento se observa después de un ciclo tanto en los animales sacrificados el 4º día del protocolo inmediatamente después de haber retirado el etanol como en los animales sacrificados 24 horas más tarde. Resultados similares se observaron cuando el protocolo DID se repitió durante 4 ciclos. Este resultado indica que hay una alteración en la permeabilidad de la BHE independiente de los ciclos de exposición que probablemente facilite el paso de moléculas que no atravesarían la barrera en animales controles y que este aumento en la permeabilidad se mantiene cuando ya no hay presencia de etanol en la sangre.

La extravasación de IgG al parénquima cerebral puede ser la consecuencia de una alteración en la integridad de la barrera (Rosenberg et al., 1996, Mun-Bryce y Rosenberg, 1998, Gasche et al., 1999, Heo et al., 1999, Sternlicht y Werb, 2001, Rosenberg, 2002). En base a estos resultados, el siguiente objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar la expresión de dos proteínas que son los componentes principales de la matriz extracelular, la laminina y el colágeno tipo IV. Alteraciones en la expresión de laminina y colágeno IV producirían una anomalía estructural y consecuentemente disfunción de la BHE que podría ser responsable del incremento en la permeabilidad observada. Mediante inmunohistoquímica se observó que la expresión de laminina no se modifica después de la exposición a un ciclo de consumo en el giro dentado, ni en CA1 ni en CA3. En cambio tras 4 ciclos de exposición de etanol se observó una disminución de la expresión de laminina en CA1 y CA3 pero no en giro dentado. Este efecto indica una reducción en la expresión de esta proteína inmediatamente y 24 horas después de retirar el etanol. En cuanto a la expresión del colágeno IV, esta disminuyó en giro dentado, CA1 y CA3. A diferencia de laminina el efecto del etanol sobre la expresión de colágeno IV en CA1 y CA3 se observó no sólo después de la exposición a 4 ciclos de etanol sino después de la exposición a 1 ciclo de etanol inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h. Además, la exposición de etanol afecta el colágeno IV del giro dentado, área que es resistente a la degradación de laminina. Estos resultados sugieren que las disminuciones en la expresión de laminina y de colágeno IV podrían contribuir, de manera distinta, al aumento de permeabilidad observado mediante la extravasación de IgG. Se puede deducir que el colágeno IV tiene una importancia mayor en este aumento de la permeabilidad dado que la disminución de su expresión se puede apreciar ya después de un ciclo de consumo, tiempo al cual también se produce la extravasación de IgG. Además numerosos estudios han demostrado que el etanol actúa sobre las células que forman el endotelio vascular, observándose una disminución en la expresión de ocludina y claudin-5 en cultivos celulares de humanos (células endoteliales microvasculares del cerebro, en inglés *BMVEC*; (Haorah et al., 2005a, Haorah et al., 2007, Abdul Muneer et al., 2012) y esto nos sugiere que también podrían existir daños en las uniones estrechas

en el modelo DID que contribuirían al aumento de permeabilidad observado en el giro dentado inmediatamente después de un ciclo.

Tanto el colágeno IV como la laminina son sustratos de diversas enzimas entre ellas las metaloproteinasas (MMPs). En un estudio realizado en cultivos celulares de *BMVEC* de alcohólicos humanos se observa un aumento de la actividad de MMP-9 que se relaciona con una disminución de la expresión de colágeno IV y con un aumento de la permeabilidad al dextrano, efectos que reflejan una modificación estructural y un aumento de permeabilidad de la BHE (Haorah et al., 2008). Las MMPs son endopeptidasas dependientes de zinc y calcio fisiológicamente esenciales en el remodelado de la matriz extracelular. Sin embargo, además del papel fisiológico se les atribuye un papel deletéreo y un incremento en su activación se ha asociado a gran variedad de patologías. En particular dos de ellas (las gelatinasas MMP-9 y MMP-2) se han implicado en la degradación de componentes de la matriz extracelular que se relaciona con cambios en la integridad de la BHE (Kieseier et al., 1999b, Lindberg et al., 2001, Montaner et al., 2001b, Bonoiu et al., 2009, Zhou et al., 2011). Los estudios de zimografía en gel demuestran que el consumo de etanol en el protocolo DID no induce ninguna variación en la actividad de MMP-2 pero disminuye la actividad de MMP-9. Este es un resultado sorprendente puesto que en gran variedad de patologías incluyendo el SIDA y la isquemia cerebral (Kieseier et al., 1999a, Montaner et al., 2001a, Bonoiu et al., 2009, Zhou et al., 2011), así como tras la administración de drogas de abuso como la 3,4-metilenodioximetanfetamina (Rubio-Araiz et al., 2014) y metanfetamina (Urrutia et al., 2013, Rubio-Araiz et al., 2014), se ha observado la sobreactivación de MMP-9. Este incremento en la actividad de metaloproteinasas conduce a una degradación de componentes de la matriz extracelular y a un aumento en la permeabilidad de la BHE. Por otro lado estudios con ratas relacionan la disminución de MMP-9 en hipocampo con cambios en la matriz extracelular que inducirían posibles efectos sobre la arquitectura dendrítica y la fisiología sináptica (Szklarczyk et al., 2002). En particular nuestros resultados concuerdan con un estudio de Wright y colaboradores (Wright et al., 2003) en el cual se ha demostrado como en ratas sometidas a diferentes concentraciones de etanol (inyección ip con 1g/kg, 1.5 g/kg, 2g/kg) no varía la actividad enzimática de MMP-2 y disminuye, de manera dosis dependiente, la

actividad enzimática de MMP-9 en hipocampo; Wright y col. relacionan esta disminución con una menor memoria espacial evaluada con test comportamentales (*motor test battery* y *circular water maze*) atribuyendo los cambios a una menor remodelación de la matriz extracelular y por tanto una menor plasticidad sináptica.

En cuanto a los mecanismos que podrían producir la disminución en la actividad de MMP-9, un estudio reciente atribuye la disminución de la actividad de MMPs producido por alcohol *in vitro* a la unión covalente entre el zinc catalítico de las MMPs y el grupo hidroxilo del alcohol (Tezvergil-Mutluay et al., 2011); no obstante no hay evidencias de que este efecto se produzca *in vivo*. Independientemente del mecanismo que produce esta disminución en la actividad, lo que se desprende de estos resultados es que ni MMP-9 ni MMP-2 son responsables de la disminución en la expresión de laminina y colágeno IV que observamos en hipocampo en nuestro modelo. Esto concuerda con el estudio de Savarin y colaboradores (Savarin et al., 2011) en el cual se observó, en un modelo de encefalopatía viral en ratones C57BL/6, una permeabilidad de la BHE similar entre animales controles y animales MMP-9-KO; en el mismo estudio se demostró la importancia del aumento de la expresión de MMP-3 en la mayor permeabilidad de la BHE detectada con fluoresceína de sodio (inyectada en los animales 10 minutos antes del sacrificio) en animales MMP-9-KO y en ausencia del aumento de otras MMPs como MMP-2 y MMP-12.

En esta Tesis se evaluó también la actividad de MMP-3 cuyo aumento está relacionado con otras enfermedades como con la espondilitis anquilosante (Chen et al., 2006) o con una un variación de los niveles de beta amiloide, proteína que desempeña un papel clave en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer (Reitz et al., 2010).

Con estos antecedentes y teniendo en cuenta que la MMP-3 podría degradar tanto la laminina como el colágeno IV estudiamos el efecto del etanol con nuestro protocolo DID sobre la actividad enzimática de esta enzima. Se observó un incremento en la actividad de MMP-3 en hipocampo de ratón en los dos tiempos estudiados, inmediatamente y 24 horas tras la retirada de etanol, que podría estar relacionado con el aumento de la degradación observado en laminina y colágeno IV.

Por otro lado, las MMPs no son las únicas enzimas que pueden degradar la matriz extracelular. La plasmina, serina proteasa que se libera en forma de plasminógeno y se activa gracias a la acción de activadores como el activador tisular del plasminógeno (t-PA), es una enzima conocida sobre todo por su efecto anticoagulante. Además de esta función, la plasmina degrada componentes de la matriz extracelular de manera directa, degradando por ejemplo laminina y colágeno de tipo IV (Ichinose et al., 1986, Chen y Strickland, 1997, Chen et al., 2003) o activando las MMPs entre ellas MMP-3 (Carmeliet et al., 1997). Estudios en ratones C57BL6 *Knockout* para t-PA (t-PA KO) implican a la plasmina en la degradación de laminina que facilita la neurodegeneración inducida por el consumo crónico de alcohol (Skrzypiec et al., 2009). Se ha demostrado en cultivos de astrocitos (Zhang et al., 2014) como el etanol (a concentraciones de 25, 50, y 75 mM que corresponden a 0.12, 0.23 y 0.35 g/dL respectivamente) es capaz de aumentar la expresión de t-PA y parece que este efecto podría estar relacionado con la inhibición de la plasticidad neuronal mediada por astrocitos. En nuestro protocolo DID hemos observado un aumento en la expresión y en la actividad enzimática de la t-PA tanto inmediatamente tras haber retirado el etanol como a las 24 horas tras 4 ciclos de exposición. t-PA se analizó mediante Western blot y zimografía en gel y las diferencias se apreciaron más en zimografía; aunque las dos técnicas se consideran una medida de la expresión de la enzima, la zimografía revela la fracción con actividad *ex vivo*, mientras que la inmunodetección por Western blot detecta toda la proteína presente en la muestra. Estas dos poblaciones no tienen por qué coincidir necesariamente y de hecho, el grado de solapamiento entre ellas varía de una MMP a otra. Otro factor que puede contribuir a la discrepancia observada es la diferencia entre las sensibilidades de las técnicas, ya que la actividad detectada en la zimografía puede corresponder a cantidades de proteína en el orden de picogramos (Kleiner y Stetler-Stevenson, 1994), posiblemente por debajo del límite de detección de las mediciones realizadas por Western blot.

El hecho de que observemos un aumento de la expresión de MMP-3 y de t-PA a los mismos tiempos en los cuales observamos la disminución en laminina y colágeno IV nos podría indicar una importante contribución de estos factores a la degradación de la lámina basal aunque es verdad que se necesitarían

estudios adicionales para poder comprobar que en ausencia de un aumento en la actividad de MMP-3 no se produciría degradación de laminina .

En esta Tesis Doctoral se ha estudiado también la capacidad del etanol en el paradigma *Drinking in the Dark* para producir neuroinflamación. La neuroinflamación es una característica común en muchas enfermedades neurológicas tales como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, en esclerosis múltiple, en ictus (Chen et al., 2006, Maracchioni et al., 2007) y podría ser consecuencia de una disfunción de la BHE (Daneman y Rescigno, 2009) que daría lugar al paso de agentes patógenos al cerebro. La activación glial es crítica en los procesos de neuroinflamación (Streit et al., 2004; Block et al., 2007). Estudios recientes tanto en cultivos de astrocitos de rata como en cultivos de microglía de rata y ratón han demostrado como el etanol induce un aumento de la activación glial, parámetro que indica un aumento de neuroinflamación (Guerra y Renau-Piqueras, 1997, Fernandez-Lizarbe et al., 2009). Por otro lado otros estudios han indicado, utilizando células endoteliales humanas, que el alcohol podría inducir alteraciones en BHE alterando las cadenas ligeras de la miosina y alteraciones de las uniones estrechas (Haorah et al., 2007), permitiendo la infiltración de células inflamatorias (macrófagos, leucocitos, etc.) que promoverían la liberación de las citoquinas y procesos neuroinflamatorios. En base a que la exposición crónica a etanol produce inflamación y que las células gliales tienen capacidad de secretar factores que degradan la BHE, y por otra parte, que el aumento de permeabilidad de la BHE podría, a su vez, aumentar la inflamación mediante infiltrados (Roe et al., 2012), el siguiente objetivo fue estudiar la respuesta de las células gliales a la exposición de etanol. Se observó, en nuestro modelo DID, un aumento en la expresión de diferentes poblaciones astrogiales marcadas con GFAP y S100B. GFAP marca la unidad proteica esencial de la cual están constituidos los filamentos intermedios de los astrocitos. Los niveles de GFAP están relacionados con la reactividad de los astrocitos y GFAP juega un papel fundamental en el mantenimiento estructural de la morfología de los astrocitos (Leventopoulos et al., 2007). La proteína S100B promueve la aparición de los gliofilamentos astrogiales en el citoesqueleto. Este componente del citoesqueleto en astrocitos tiene una importancia vital para el establecimiento del aparato de succión, a través del cual estas células absorben desde los

capilares los metabolitos necesarios para el mantenimiento de las neuronas. La estrecha relación entre las prolongaciones astrogliales, las células endoteliales que constituyen los capilares y las proteínas de la matriz extracelular es la base de la estructura de la BHE gracias a la cual las sustancias nocivas no afectan de manera directa las neuronas. S100B está implicado también en la regulación de varias actividades intracelulares, tales como el metabolismo celular, la modificación del citoesqueleto, la proliferación celular, la diferenciación (Donato, 2003, Donato et al., 2009) y la actividad trófica en neuronas y en células gliales con implicaciones en la supervivencia neuronal (Van Eldik y Wainwright, 2003, Tramontina et al., 2006). Además, se secreta desde el interior de los astrocitos al espacio extracelular y es por esta razón que se utiliza como marcador de astrocitos (Shiyya et al., 2004, Donato et al., 2009, Ye et al., 2011). Concentraciones nanomolares de S100B estimulan el crecimiento de neuritas, mejoran la supervivencia de las neuronas y actúan como un factor neurotrófico y de supervivencia neuronal (Donato, 2003, Rothermundt et al., 2003, Donato et al., 2009). Por otro lado, las concentraciones micromolares estimulan la liberación de citoquinas proinflamatorias, inducen apoptosis y actúa como factor neurotóxico induciendo apoptosis neuronal (Donato, 2003, Rothermundt et al., 2003, Donato et al., 2009). Los astrocitos liberan constitutivamente S100B y la liberación se ve reforzada por la exposición de los astrocitos a agonistas de la serotonina, a glutamato, al ácido lisofosfatídico o al factor de necrosis tumoral (TNF α ; (Brozzi et al., 2009). La concentración sérica de S100B aumenta en patologías como la depresión y disminuye con un tratamiento antidepresivo (Schroeter et al., 2002). Se han encontrado altos niveles de S100B en tejido cerebral en pacientes con enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Griffin y Barger, 2010). Algunos estudios demuestran que su concentración también aumenta con estrés crónico y prenatal en hipocampo y corteza prefrontal (Barros et al., 2006, Ye et al., 2011). La sobreproducción de S100B puede inducir disfunción neuronal e inflamación (Donato et al., 2009). El aumento en la expresión de GFAP y de S100B es evidente 24 horas después de 4 ciclos de exposición, es decir *a posteriori* de que hubiera un aumento en la permeabilidad de la BHE, indicando que la activación glial observada podría ser una consecuencia y no una causa.

A diferencia de los cambios producidos sobre el estado de los astrocitos, en el caso de la microglía no se observa incremento alguno en el marcaje de Iba-1 lo que indica que estas células gliales no están activadas sino que permanecen en estado de reposo. La falta de activación de la microglia podría ser debida a que los astrocitos, las células más abundantes en el cerebro, pueden secretar uno o más factores capaces de modular la activación microglial mediante la regulación de los niveles microgliales de especies reactivas del oxígeno (ROS; (Min et al., 2006). Por otro lado bajas dosis de S100B serian capaz de inhibir la microglia (Donato et al., 2013).

Los estudios descritos anteriormente realizados en esta Tesis Doctoral mostraban que los efectos más significativos y evidentes se aprecian después de 4 ciclos de exposición a etanol. La disminución de la expresión de colágeno IV es más evidente, ya que se observa en las tres zonas estudiadas después de 4 ciclos. De manera similar los cambios en laminina, GFAP y S100B sólo se observan después de 4 ciclos de exposición a etanol. Por este motivo, el resto de los estudios que constituyen esta Tesis Doctoral se centraron en los efectos producidos por etanol tras 4 ciclos de consumo.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la activación glial se considera un marcador de neuroinflamación y se asocia con patologías de origen neurodegenerativo (Heneka et al., 2005, Ahmed et al., 2010). Por otro lado, si bien no se conocen con certeza los mecanismos responsables del daño que produce el etanol, se sabe que su abuso puede causar daño cerebral, disfunciones cognitivas y neurológicas y, en algunos casos, neurodegeneración (Crews y Nixon, 2009) siendo muy tóxico para las células neuronales (Pascual et al., 2007). Estudios en animales experimentales muestran, que el consumo de alcohol crónico (Crews et al., 2004) o la administración intragástrica de 10-12 g/kg durante 4 días induce neurodegeneración corticolímbica (Crews et al., 2006). En humanos se ha demostrado que su abuso puede causar muerte neuronal y reducción de la masa cerebral (de la Monte, 1988) y en trabajos realizados postmortem en cerebros de alcohólicos se ha observado un aumento de células positivas para TUNEL (Ikegami et al., 2003). De acuerdo con estos datos en nuestros animales, sometidos al protocolo DID de 4 ciclos, se observó un aumento en la muerte neuronal utilizando el marcaje con Fluoro-Jade, que produce una tinción selectiva de los cuerpos celulares, axones y

terminales neuronales degenerados (Schmued et al., 1997, Schmued y Hopkins, 2000), inmediatamente tras haber retirado el etanol y a las 24h. Se ha demostrado como un solo episodio de intoxicación de etanol el día 7 postnatal induce una masiva neurodegeneración en el cerebro de roedores en desarrollo (Ikonomidou et al., 2000); lo que lleva a la disfunción neuronal (Izumi et al., 2005a, Izumi et al., 2005b, Wilson et al., 2011, Sadrian et al., 2012, Subbanna et al., 2013a, Subbanna et al., 2013b). El etanol induce acetilación de histona 3 (Subbanna et al., 2014), aumenta la liberación del citocromo C (Saito et al., 2012) y aumenta caspasa-3 en corteza y tálamo (Olney et al., 2002, Han et al., 2005, Ullah et al., 2013), factores que conducen a neurodegeneración en ratones recién nacidos. En ratas adolescentes la exposición a vapores de etanol al 96%, hasta llegar a una concentración plasmática de 225 mg/dl, se observa un aumento en caspasa 3 en hipocampo y un aumento de muerte neuronal (Ehlers et al., 2013).

Estudios recientes demuestran la implicación de los receptores *Toll-like* en la neuroinflamación y neurodegeneración inducida por etanol. En ratas se demostró que los TLR4 tienen un papel crucial en el aumento de mediadores inflamatorios y en la hipertrofia glial asociado al consumo y/o abuso de alcohol (Vallés et al., 2004, Blanco y Guerri, 2007). Además, utilizando ratones deficientes en TLR4, Alfonso-Loeches y colaboradores demostraron el papel fundamental de TLR4 en la neuroinflamación y la degeneración neuronal inducida por el etanol (Alfonso-Loeches et al., 2010). En ratones deficientes en TLR4 el consumo crónico de etanol no activa las células astrogliales y la consecuente inducción de mediadores de la inflamación, lo que sugiere que la señalización mediada por TLR4 es esencial en la neuroinflamación inducida por etanol. Por otro lado, en cultivos de astrocitos humano se ha demostrado que el alcohol induce activación de los receptores TLR (Floreani et al., 2010).

En base al papel de los TLR4 en la neuroinflamación y neurodegeneración por exposición crónica a etanol y teniendo en cuenta el aumento en activación glial y en muerte neuronal producido por la exposición a 4 ciclos de DID mostrados en esta Tesis Doctoral se determinó la expresión del TLR4 para evaluar su posible implicación en los efectos de etanol sobre la BHE. Observamos un aumento en la expresión del TLR4 inmediatamente después de haber retirado el etanol y 24 horas más tarde. Sin embargo, un aumento en la expresión del

receptor no se traduce necesariamente en una activación del receptor y por lo que a continuación se estudió la expresión de varias proteínas implicadas en la activación y señalización del TLR4. En primer lugar se exploró la activación del TLR4 utilizando la expresión de HMGB1, una proteína ligando de diferentes receptores de membrana incluyendo TLR4. Tras 4 ciclos de exposición inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24h observamos un aumento en la expresión de HMGB1. La secreción de HMGB1 en el espacio extracelular está controlada por un mecanismo dependiente de calcio (Oh et al., 2009) y se ha demostrado que monocitos y macrófagos secretan HMGB1 tras estímulos inflamatorios inducidos por LPS, TNF- α o interleuquina-1 (Wang et al., 1999). Después de su liberación, la HMGB1 interactúa con una serie de receptores en la membrana celular y, en particular, con TLR2 y TLR4. La interacción con estos receptores induce la activación de las vías de señalización de estos receptores (Anderson, 2000, Degryse et al., 2001) y en particular su unión a TLR4 induce activación de la vía dependiente de Myd88 y consecuentemente la activación de las MAPK (JNK p54/p46, ERKp44/p42 y p38) (Lien et al., 2000, Matsuguchi et al., 2003, Miller et al., 2005, Chen et al., 2006, Gutiérrez-Venegas et al., 2006). Es razonable pensar, por tanto, que un aumento en la expresión de TLR4 y del ligando HMGB1 como ocurre en nuestro modelo podría producir un aumento en la activación del receptor TLR4 y de las moléculas implicadas en su vía de señalización. Se estudió, por tanto, la expresión de MyD88, la proteína adaptadora específica de TLRs (Wang et al., 2009). Con la excepción de TLR3, todos los TLR conocidos dependen totalmente o parcialmente (como es el caso de TLR4) de Myd88 para la transducción de señales intracelulares (Barton y Medzhitov, 2003a, b). La exposición de ratones a 4 ciclos de etanol aumentó la expresión de esta proteína 24 h después de la retirada de etanol, confirmando así la hipótesis de que un aumento en la expresión del receptor y de uno de sus ligandos aumentaría la señalización intracelular relacionada con TLR4. Recientes estudios en células astrogiales han demostrado como la activación del receptor TLR4 estimula la activación de vías de señalización y factores de transcripción (MAPK, NF- κ B, AP-1; (Blanco et al., 2005, Blanco et al., 2008). Basándonos en el incremento en la expresión de HMGB1, TLR4 y MyD88, el siguiente objetivo fue estudiar la expresión de las MAPK (MAPK de sus siglas en inglés mitogen-

activated protein kinases). Las MAPK, son una serie de serin-treonin quinasas que median la señalización intracelular y se asocian a una gran variedad de actividades celulares como supervivencia, diferenciación, proliferación y muerte (Kim y Choi, 2010). En primer lugar se determinó la expresión de las MAPK. La exposición a 4 ciclos de etanol aumentó la expresión de la forma fosforilada de p-38 (p-p-38) y de ERK (p-ERK 1/2), siendo estas las formas activas de las enzimas, mientras que no se observó ninguna diferencia en la expresión de la forma fosforilada de JNK. El aumento en la expresión de p-ERK1/2 se observó inmediatamente después de haber retirado el etanol y a las 24 horas, mientras que el aumento de p-p-38 se observó sólo después de 24 horas. La activación de ERK1/2 y p-38 ha sido asociada en estudios en cultivos humanos de córnea con la fosforilación de las proteínas de la BHE con consecuente ruptura de las uniones estrechas (Wang et al., 2004). Se ha demostrado que p-38 induce un marcado aumento en la expresión de proteasas específicas de la matriz extracelular incluyendo metaloproteinasas de la matriz, MMP-3, MMP-9 y MMP-10 (Turner et al., 2010).

Como se ha explicado más arriba la activación de los receptores TLR4 puede inducir la translocación al núcleo de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 y la consecuente producción de TNF- α , factor implicado en muchos mecanismo celulares como por ejemplo la regulación de las células inmunes y la muerte apoptótica. p-ERK1/2 es una de las principales proteínas que activa la subunidad c-fos del factor de transcripción AP-1, proteína responsable de la activación de NF- κ B que induce la producción de TNF- α . De acuerdo con el incremento en la expresión de P-ERK1/2, la exposición a 4 ciclos de DID también aumentó la expresión de c-fos tanto inmediatamente después como a las 24 horas tras retirar el etanol. Nuestros resultados muestran que la activación de TLR4 y de su vía MyD88-dependiente (con la consecuente activación de p-ERK1/2 y c-fos) podría ser uno de los mecanismos que participan en las alteraciones en la BHE y en la muerte neuronal inducidas por el consumo intensivo de etanol definido como *binge drinking*.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la ausencia del TLR 4 evita la activación de la cascada inflamatoria inducida en astrogliá por la exposición crónica a etanol (Alfonso-Loeches et al., 2010). Para comprobar que el

incremento en la expresión y señalización del receptor TLR4 producido por la exposición de 4 ciclos de DID estaba implicado tanto en los cambios en la BHE como en la neuroinflamación inducida por etanol, se sometieron ratones TLR4-KO a 4 ciclos de etanol sacrificando los animales 24 horas después de suprimir el consumo ya que los cambios producidos por el etanol son más evidentes a este tiempo. En los animales *WT* se observó un aumento de la expresión de S100B en las tres áreas del hipocampo estudiadas, incremento que no se observa en los animales TLR4-KO. Este incremento en la expresión de S100B es indicativo de activación astrogliar y su ausencia en los ratones TLR4-KO sugiere que los TLR4 desempeñan un papel importante en esta activación.

En cuanto a la permeabilidad de la BHE en los ratones *WT* expuestos a etanol aumenta la extravasación de IgG en giro dentado, CA1 y CA3, efecto que no se produce en los animales TLR4-KO. Esto indica que en los animales TLR4-KO el etanol no induce la alteración de permeabilidad observada en los animales *WT*. Para determinar si esta ausencia de efecto de etanol en TLR4-KO se producía también en la lámina basal, se estudió la expresión de laminina y colágeno IV en ausencia del receptor. De forma similar a lo que ocurre con la permeabilidad de la BHE, en ratones TLR4-KO no se observa disminución en la expresión de laminina, efecto que sí se observa en los ratones *WT*. La ausencia de efecto de etanol en los ratones TLR4-KO también se observa en colágeno IV cuya expresión en animales TLR4-KO expuestos a etanol era similar a aquella en animales TLR4-KO que no fueron expuestos a etanol. Estas observaciones indican que el TLR4 es importante en la degradación de laminina y colágeno IV producida por el etanol en los animales *WT*.

Es interesante además señalar que se observa una menor expresión basal de colágeno IV en los animales TLR4-KO que en animales *WT* y sin embargo la permeabilidad basal de la BHE de los dos tipos de ratones es similar lo que sugiere que el papel de los TLR4 es más importante cuando los animales se exponen a etanol que en situaciones fisiológicas.

Para determinar el papel de TLR4 en la muerte neuronal producida por el consumo intensivo y repetido de etanol se realizó un estudio de tinción con Fluoro-Jade observándose en los animales *WT* expuestos a etanol un aumento de células marcadas positivamente tanto en giro dentado como en CA3, efecto que no se observó en los animales TLR4-KO indicando que los TLR están

implicados en los procesos que conducen a la muerte neuronal observada en animales sometidos a 4 ciclos de DID.

En conjunto estos datos indican que la vía de señalización regulada por el receptor TLR4 juega un papel importante en las modificaciones estructurales y en el aumento de permeabilidad de la BHE inducidos en el hipocampo por la exposición de ratones a etanol utilizando el modelo de *binge drinking* DID. Además, los resultados observados sobre expresión de S100B y sobre tinción con Fluoro-Jade indican que este receptor también es importante en la activación glial y en la muerte neuronal producida por el consumo intensivo y repetido de etanol.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El consumo intensivo y repetido de etanol aumenta la permeabilidad de la BHE en hipocampo de ratón que se refleja en un aumento de extravasación de IgG. Este efecto no está relacionado con el número de ciclos ni con el tiempo transcurrido después de la retirada de etanol.
2. El aumento en la permeabilidad de la BHE producido por etanol parece estar relacionado fundamentalmente con un aumento en la degradación de colágeno IV.
3. El efecto del etanol sobre la expresión de las proteínas que forman la matriz extracelular es más pronunciado en CA1 y CA3 que en giro dentado.
4. La degradación de laminina y colágeno IV no se correlaciona en el tiempo con una mayor actividad de MMP-9 y MMP-2, sino que podría deberse a un aumento en la actividad de MMP-3 y a un aumento de la expresión y actividad de t-PA.
5. El etanol induce una moderada respuesta astrogliar que no parece estar implicada en la muerte neuronal.
6. El aumento en la expresión del receptor de tipo *Toll* 4 y de algunas de las proteínas implicadas en su señalización como HMGB1, MyD88, p-ERK 1/2, p-p-38 y c-fos indica que el etanol incrementa la activación de este receptor.
7. En los ratones TLR4-KO el consumo de etanol no modifica la permeabilidad, ni la estructura de la BHE, no induce respuesta astrogliar y no provoca muerte neuronal, lo cual indica que este receptor está implicado en los cambios inducidos por etanol en ratones *WT*.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200:629-638.
- Abbott NJ (2004) Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int* 45:545-552.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Abdul Muneer PM, Alikunju S, Szlachetka AM, Haorah J (2012) The mechanisms of cerebral vascular dysfunction and neuroinflammation by MMP-mediated degradation of VEGFR-2 in alcohol ingestion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1167-1177.
- Abid MR, Spokes KC, Shih SC, Aird WC (2007) NADPH oxidase activity selectively modulates vascular endothelial growth factor signaling pathways. *J Biol Chem* 282:35373-35385.
- Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007-1019.
- Agster KL, Fortin NJ, Eichenbaum H (2002) The hippocampus and disambiguation of overlapping sequences. *J Neurosci* 22:5760-5768.
- Aguayo LG, Tapia JC, Pancetti FC (1996) Potentiation of the glycine-activated Cl⁻ current by ethanol in cultured mouse spinal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 279:1116-1122.
- Ahmed AS, Li J, Ahmed M, Hua L, Yakovleva T, Ossipov MH, Bakalkin G, Stark A (2010) Attenuation of pain and inflammation in adjuvant-induced arthritis by the proteasome inhibitor MG132. *Arthritis Rheum* 62:2160-2169.
- Aikens ML, Grenett HE, Benza RL, Tabengwa EM, Davis GC, Booyse FM (1998) Alcohol-induced upregulation of plasminogen activators and fibrinolytic activity in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res* 22:375-381.
- Aird WC (2005) Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* 3:1392-1406.
- Akira S (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 311:1-16.
- Albrecht C, McVey JH, Elliott JI, Sardini A, Kasza I, Mumford AD, Naoumova RP, Tuddenham EG, Szabo K, Higgins CF (2005) A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. *Blood* 106:542-549.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30:8285-8295.

- Alikunju S, Abdul Muneer PM, Zhang Y, Szlachetka AM, Haorah J (2011) The inflammatory footprints of alcohol-induced oxidative damage in neurovascular components. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1:S129-136.
- Allain FH, Yen YM, Masse JE, Schultze P, Dieckmann T, Johnson RC, Feigon J (1999) Solution structure of the HMG protein NHP6A and its interaction with DNA reveals the structural determinants for non-sequence-specific binding. *EMBO J* 18:2563-2579.
- Almholt K, Green KA, Juncker-Jensen A, Nielsen BS, Lund LR, Rømer J (2007) Extracellular proteolysis in transgenic mouse models of breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12:83-97.
- Anderson KV (2000) Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol* 12:13-19.
- Andreasen PA, Kjølner L, Christensen L, Duffy MJ (1997) The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 72:1-22.
- Andreeva AV, Kutuzov MA (2001) Nuclear localization of the plant protein Ser/Thr phosphatase PP7. *Mol Cell Biol Res Commun* 4:345-352.
- Anwer J, Soliman MR (1995) Ethanol-induced alterations in beta-endorphin levels in specific rat brain regions: modulation by adenosine agonist and antagonist. *Pharmacology* 51:364-369.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97:512-523.
- Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C (2010) Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468:557-561.
- Asahi, M., et al., 2001. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 21, 7724-32.
- Atkinson KJ, Rao RK (2001) Role of protein tyrosine phosphorylation in acetaldehyde-induced disruption of epithelial tight junctions. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G1280-1288.
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24:326-332.
- Avison MJ, Nath A, Greene-Avison R, Schmitt FA, Bales RA, Ethisham A, Greenberg RN, Berger JR (2004) Inflammatory changes and breakdown of microvascular integrity in early human immunodeficiency virus dementia. *J Neurovirol* 10:223-232.
- Bake S, Tingling JD, Miranda RC (2012) Ethanol exposure during pregnancy persistently attenuates cranially directed blood flow in the developing fetus: evidence from ultrasound imaging in a murine second trimester equivalent model. *Alcohol Clin Exp Res* 36:748-758.

- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16:1-13.
- Barros VG, Duhalde-Vega M, Caltana L, Brusco A, Antonelli MC (2006) Astrocyte-neuron vulnerability to prenatal stress in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 83:787-800.
- Barton GM, Medzhitov R (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300:1524-1525.
- Barton GM, Medzhitov R (2003a) Linking Toll-like receptors to IFN-alpha/beta expression. *Nat Immunol* 4:432-433.
- Barton GM, Medzhitov R (2003b) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 300:1524-1525.
- Bauer B, Hartz AM, Miller DS (2007) Tumor necrosis factor alpha and endothelin-1 increase P-glycoprotein expression and transport activity at the blood-brain barrier. *Mol Pharmacol* 71:667-675.
- Bazzoni G, Dejana E (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 84:869-901.
- Becker HC, Lopez MF (2004) Increased ethanol drinking after repeated chronic ethanol exposure and withdrawal experience in C57BL/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1829-1838.
- Béduneau A, Saulnier P, Benoit JP (2007) Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials* 28:4947-4967.
- Begley DJ (1996) The blood-brain barrier: principles for targeting peptides and drugs to the central nervous system. *J Pharm Pharmacol* 48:136-146.
- Begley DJ (2004) Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* 104:29-45.
- Belknap JK, Crabbe JC, Young ER (1993) Voluntary consumption of ethanol in 15 inbred mouse strains. *Psychopharmacology (Berl)* 112:503-510.
- Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, LaRue B, Deane R, Zlokovic BV (2010) Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68:409-427.
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małeckci A (2008) Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep* 60:600-622.
- Bianchi ME, Manfredi AA (2007) High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol Rev* 220:35-46.
- Bisby JA, Leitz JR, Morgan CJ, Curran HV (2010) Decreases in recollective experience following acute alcohol: a dose-response study. *Psychopharmacology (Berl)* 208:67-74.
- Blanco AM, Guerri C (2007) Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Front Biosci* 12:2616-2630.

- Blanco AM, Vallés SL, Pascual M, Guerri C (2005) Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol* 175:6893-6899.
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, Banchereau J (2008) Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 19:41-52.
- Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, Rubartelli A, Agresti A, Bianchi ME (2003) Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 22:5551-5560.
- Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P (2011) The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* 8:8.
- Bonoiu A, Mahajan SD, Ye L, Kumar R, Ding H, Yong KT, Roy I, Aalinkeel R, Nair B, Reynolds JL, Sykes DE, Imperiale MA, Bergey EJ, Schwartz SA, Prasad PN (2009) MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier. *Brain Res* 1282:142-155.
- Borisenko SA (1990) Effects of drugs on blood-brain barrier permeability in rats chronically intoxicated by ethanol. *Ann Ist Super Sanita* 26:39-42.
- Borst P, Elferink RO (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71:537-592.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43:281-291.
- BRADBURY MW, STUBBS J, HUGHES IE, PARKER P (1963) THE DISTRIBUTION OF POTASSIUM, SODIUM, CHLORIDE AND UREA BETWEEN LUMBAR CEREBROSPINAL FLUID AND BLOOD SERUM IN HUMAN SUBJECTS. *Clin Sci* 25:97-105.
- Brasser SM, Spear NE (2002) Physiological and behavioral effects of acute ethanol hangover in juvenile, adolescent, and adult rats. *Behav Neurosci* 116:305-320.
- Brozzi F, Arcuri C, Giambanco I, Donato R (2009) S100B Protein Regulates Astrocyte Shape and Migration via Interaction with Src Kinase: IMPLICATIONS FOR ASTROCYTE DEVELOPMENT, ACTIVATION, AND TUMOR GROWTH. *J Biol Chem* 284:8797-8811.
- Budygin EA, Phillips PE, Wightman RM, Jones SR (2001) Terminal effects of ethanol on dopamine dynamics in rat nucleus accumbens: an in vitro voltammetric study. *Synapse* 42:77-79.
- Burk O, Arnold KA, Nussler AK, Schaeffeler E, Efimova E, Avery BA, Avery MA, Fromm MF, Eichelbaum M (2005) Antimalarial artemisinin drugs induce cytochrome P450 and MDR1 expression by activation of xenosensors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 67:1954-1965.
- Butler CR, Zeman A (2008) A case of transient epileptic amnesia with radiological localization. *Nat Clin Pract Neurol* 4:516-521.
- Campbell AD, McBride WJ (1995) Serotonin-3 receptor and ethanol-stimulated dopamine release in the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 51:835-842.

- Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA (2009) Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 158:983-994.
- Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI (2007) Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:753-759.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Baes M, Lemaître V, Tipping P, Drew A, Eeckhout Y, Shapiro S, Lupu F, Collen D (1997) Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation. *Nat Genet* 17:439-444.
- Carvey PM, Hendey B, Monahan AJ (2009) The blood-brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *J Neurochem* 111:291-314.
- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6:650-661.
- Chandler LJ, Harris RA, Crews FT (1998) Ethanol tolerance and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 19:491-495.
- Chen CH, Lin KC, Yu DT, Yang C, Huang F, Chen HA, Liang TH, Liao HT, Tsai CY, Wei JC, Chou CT (2006) Serum matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in ankylosing spondylitis: MMP-3 is a reproducibly sensitive and specific biomarker of disease activity. *Rheumatology (Oxford)* 45:414-420.
- Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM (2007) Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol* 7:1271-1285.
- Chen ZL, Indyk JA, Strickland S (2003) The hippocampal laminin matrix is dynamic and critical for neuronal survival. *Mol Biol Cell* 14:2665-2676.
- Chen ZL, Strickland S (1997) Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 91:917-925.
- Coe IR, Yao L, Diamond I, Gordon AS (1996) The role of protein kinase C in cellular tolerance to ethanol. *J Biol Chem* 271:29468-29472.
- Compo NS, Evans JR, Carol RN, Kemp D, Villalba D, Ham LS, Rose S (2011) Alcohol intoxication and memory for events: a snapshot of alcohol myopia in a real-world drinking scenario. *Memory* 19:202-210.
- Concas A, Mascia MP, Cuccheddu T, Floris S, Mostallino MC, Perra C, Satta S, Biggio G (1996) Chronic ethanol intoxication enhances [3H]CCPA binding and does not reduce A1 adenosine receptor function in rat cerebellum. *Pharmacol Biochem Behav* 53:249-255.
- Cornford EM, Braun LD, Oldendorf WH, Hill MA (1982) Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *Am J Physiol* 243:C161-168.

- Costello DA, Watson MB, Cowley TR, Murphy N, Murphy Royal C, Garlanda C, Lynch MA (2011) Interleukin-1 α and HMGB1 mediate hippocampal dysfunction in SIGIRR-deficient mice. *J Neurosci* 31:3871-3879.
- Cox BR, Olney JJ, Lowery-Gionta EG, Sprow GM, Rinker JA, Navarro M, Kash TL, Thiele TE (2013) Repeated cycles of binge-like ethanol (EtOH)-drinking in male C57BL/6J mice augments subsequent voluntary EtOH intake but not other dependence-like phenotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 37:1688-1695.
- Cozzoli DK, Goulding SP, Zhang PW, Xiao B, Hu JH, Ary AW, Obara I, Rahn A, Abou-Ziab H, Tyrrel B, Marini C, Yoneyama N, Metten P, Snelling C, Dehoff MH, Crabbe JC, Finn DA, Klugmann M, Worley PF, Szumlinski KK (2009) Binge drinking upregulates accumbens mGluR5-Homer2-PI3K signaling: functional implications for alcoholism. *J Neurosci* 29:8655-8668.
- Crabbe JC, Metten P, Huang LC, Schlumbohm JP, Spence SE, Barkley-Levenson AM, Finn DA, Rhodes JS, Cameron AJ (2012) Ethanol Withdrawal-Associated Drinking and Drinking in the Dark: Common and Discrete Genetic Contributions. *Addict Genet* 1:3-11.
- Crabbe JC, Spence SE, Brown LL, Metten P (2011) Alcohol preference drinking in a mouse line selectively bred for high drinking in the dark. *Alcohol* 45:427-440.
- Crews DH (2006) Age of dam and sex of calf adjustments and genetic parameters for gestation length in Charolais cattle. *J Anim Sci* 84:25-31.
- Crews F, Nixon K, Kim D, Joseph J, Shukitt-Hale B, Qin L, Zou J (2006) BHT blocks NF-kappaB activation and ethanol-induced brain damage. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1938-1949.
- Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J, Noronha A (2004) Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res* 28:350-364.
- Crews FT, Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol* 44:115-127.
- Criado JR, Liu T, Ehlers CL, Mathé AA (2011) Prolonged chronic ethanol exposure alters neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor levels in the brain of adult Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 99:104-111.
- Dahl RE (2004) Adolescent brain development: a period of vulnerabilities and opportunities. Keynote address. *Ann N Y Acad Sci* 1021:1-22.
- Dalkara T, Gursoy-Ozdemir Y, Yemisci M (2011) Brain microvascular pericytes in health and disease. *Acta Neuropathol* 122:1-9.
- Damaggio AS, Gorman MR (2014) Circadian phase determines effects of repeated ethanol vapor exposure and withdrawal on body temperature and activity rhythms of male mice. *Alcohol Clin Exp Res* 38:879-888.
- Daneman R (2012) The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol* 72:648-672.

- Daneman R, Rescigno M (2009) The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different? *Immunity* 31:722-735.
- Davidson D, Camara P, Swift R (1997) Behavioral effects and pharmacokinetics of low-dose intravenous alcohol in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1294-1299.
- De Bellis MD, Clark DB, Beers SR, Soloff PH, Boring AM, Hall J, Kersh A, Keshavan MS (2000) Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. *Am J Psychiatry* 157:737-744.
- De Boer AG, van der Sandt IC, Gaillard PJ (2003) The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:629-656.
- De la Monte SM (1988) Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol* 45:990-992.
- De Wit H (2009) Impulsivity as a determinant and consequence of drug use: a review of underlying processes. *Addict Biol* 14:22-31.
- DeBault LE, Cancilla PA (1980) gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207:653-655.
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Müller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME (2001) The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 152:1197-1206.
- Deitrich RA, Dunwiddie TV, Harris RA, Erwin VG (1989) Mechanism of action of ethanol: initial central nervous system actions. *Pharmacol Rev* 41:489-537.
- Dejana E (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:261-270.
- Demeule M, Labelle M, Régina A, Berthelet F, Béliveau R (2001) Isolation of endothelial cells from brain, lung, and kidney: expression of the multidrug resistance P-glycoprotein isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 281:827-834.
- Di Chiara G, Camba R, Spano PF (1971) Evidence for inhibition by brain serotonin of mouse killing behaviour in rats. *Nature* 233:272-273.
- Dole VP, Gentry RT (1984) Toward an analogue of alcoholism in mice: scale factors in the model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:3543-3546.
- Donato R (2003) Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60:540-551.
- Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL (2013) Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 13:24-57.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 1793:1008-1022.
- Doremus TL, Brunell SC, Rajendran P, Spear LP (2005) Factors influencing elevated ethanol consumption in adolescent relative to adult rats. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1796-1808.

- Dougherty DM, Marsh-Richard DM, Hatzis ES, Nouvion SO, Mathias CW (2008) A test of alcohol dose effects on multiple behavioral measures of impulsivity. *Drug Alcohol Depend* 96:111-120.
- Dry MJ, Burns NR, Nettelbeck T, Farquharson AL, White JM (2012) Dose-related effects of alcohol on cognitive functioning. *PLoS One* 7:e50977.
- Eferl R, Wagner EF (2003) AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-868.
- Ehlers CL, Liu W, Wills DN, Crews FT (2013) Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience* 244:1-15.
- Eichenbaum H (2004) Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120.
- El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD (2007) Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med* 13:432-438.
- Ellwood KB, Yen YM, Johnson RC, Carey M (2000) Mechanism for specificity by HMG-1 in enhanceosome assembly. *Mol Cell Biol* 20:4359-4370.
- Elmas I, Küçük M, Kalayci RB, Cevik A, Kaya M (2001) Effects of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability in acute and chronically ethanol treated rats. *Forensic Sci Int* 119:212-216.
- Enerson BE, Drewes LR (2006) The rat blood-brain barrier transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:959-973.
- Ezan P, André P, Cisternino S, Saubaméa B, Boulay AC, Doutremer S, Thomas MA, Quenech'du N, Giaume C, Cohen-Salmon M (2012) Deletion of astroglial connexins weakens the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 32:1457-1467.
- Farkas E, Luiten PG (2001) Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 64:575-611.
- Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, Gruber K (1988) Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci* 529:21-30.
- Fernández M, Fabio MC, Nizhnikov ME, Spear NE, Abate P, Pautassi RM (2013) Maternal isolation during the first two postnatal weeks affects novelty-induced responses and sensitivity to ethanol-induced locomotor activity during infancy. *Dev Psychobiol*.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C (2008) Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol* 45:2007-2016.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 183:4733-4744.
- Fiacco TA, Agulhon C, McCarthy KD (2009) Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49:151-174.

- Fillmore KM, Stockwell T, Chikritzhs T, Bostrom A, Kerr W (2007) Moderate alcohol use and reduced mortality risk: systematic error in prospective studies and new hypotheses. *Ann Epidemiol* 17:S16-23.
- Fisher M (2009) Pericyte signaling in the neurovascular unit. *Stroke* 40:S13-15.
- Floreani NA, Rump TJ, Abdul Muneer PM, Alikunju S, Morsey BM, Brodie MR, Persidsky Y, Haorah J (2010) Alcohol-induced interactive phosphorylation of Src and toll-like receptor regulates the secretion of inflammatory mediators by human astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol* 5:533-545.
- Fortin NJ, Agster KL, Eichenbaum HB (2002) Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. *Nat Neurosci* 5:458-462.
- Foster SL, Medzhitov R (2009) Gene-specific control of the TLR-induced inflammatory response. *Clin Immunol* 130:7-15.
- Francis K, van Beek J, Canova C, Neal JW, Gasque P (2003) Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med* 5:1-19.
- Freeman MR (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science* 330:774-778.
- Freund G (1973) Chronic central nervous system toxicity of alcohol. *Annu Rev Pharmacol* 13:217-227.
- Freund RK, Palmer MR (1996) 8-Bromo-cAMP mimics beta-adrenergic sensitization of GABA responses to ethanol in cerebellar Purkinje neurons in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 20:408-412.
- Freund RK, Palmer MR (1997) Ethanol depression of cerebellar Purkinje neuron firing involves nicotinic acetylcholine receptors. *Exp Neurol* 143:319-322.
- Furuse M, Tsukita S (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 16:181-188.
- Gallego X, Ruiz-Medina J, Valverde O, Molas S, Robles N, Sabrià J, Crabbe JC, Dierssen M (2012) Transgenic over expression of nicotinic receptor alpha 5, alpha 3, and beta 4 subunit genes reduces ethanol intake in mice. *Alcohol* 46:205-215.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1020-1028.
- Gauley J, Pisetsky DS (2009) The translocation of HMGB1 during cell activation and cell death. *Autoimmunity* 42:299-301.
- Gerra G, Zaimovic A, Moi G, Giusti F, Gardini S, Delsignore R, Laviola G, Macchia T, Brambilla F (2002) Effects of (+/-) 3,4-methylene-dioxymethamphetamine (ecstasy) on dopamine system function in humans. *Behav Brain Res* 134:403-410.
- Gessa GL, Muntoni F, Collu M, Vargiu L, Mereu G (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 348:201-203.
- Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM, Hoffmaster KA, Ishikawa T, Keppler D, Kim RB, Lee CA, Niemi M, Polli JW, Sugiyama Y,

- Swaan PW, Ware JA, Wright SH, Yee SW, Zamek-Gliszczynski MJ, Zhang L, Consortium IT (2010) Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9:215-236.
- Gibson FC, Ukai T, Genco CA (2008) Engagement of specific innate immune signaling pathways during *Porphyromonas gingivalis* induced chronic inflammation and atherosclerosis. *Front Biosci* 13:2041-2059.
- Gilbert PE, Kesner RP, Lee I (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus* 11:626-636.
- Gilder DA, Gizer IR, Ehlers CL (2011) Item response theory analysis of binge drinking and its relationship to lifetime alcohol use disorder symptom severity in an American Indian community sample. *Alcohol Clin Exp Res* 35:984-995.
- Gill K, Menez JF, Lucas D, Deitrich RA (1992) Enzymatic production of acetaldehyde from ethanol in rat brain tissue. *Alcohol Clin Exp Res* 16:910-915.
- Gill R, Tsung A, Billiar T (2010) Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radic Biol Med* 48:1121-1132.
- Gilliam DM, Kotch LE (1996) Dose-related growth deficits in LS but not SS mice prenatally exposed to alcohol. *Alcohol* 13:47-51.
- Gilpin NW, Misra K, Herman MA, Cruz MT, Koob GF, Roberto M (2011) Neuropeptide Y opposes alcohol effects on gamma-aminobutyric acid release in amygdala and blocks the transition to alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 69:1091-1099.
- Gingrich MB, Junge CE, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci* 20:4582-4595.
- Gingrich MB, Traynelis SF (2000) Serine proteases and brain damage - is there a link? *Trends Neurosci* 23:399-407.
- Giovagnoli AR, Avanzini G (1999) Learning and memory impairment in patients with temporal lobe epilepsy: relation to the presence, type, and location of brain lesion. *Epilepsia* 40:904-911.
- Gonzales RA, Weiss F (1998) Suppression of ethanol-reinforced behavior by naltrexone is associated with attenuation of the ethanol-induced increase in dialysate dopamine levels in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 18:10663-10671.
- Griffin WS, Barger SW (2010) Neuroinflammatory Cytokines-The Common Thread in Alzheimer's Pathogenesis. *US Neurol* 6:19-27.
- Griffiths M, Neal JW, Gasque P (2007) Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82:29-55.
- Guerri C, Renau-Piqueras J (1997) Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol* 15:65-81.
- Gulati A, Nath C, Shanker K, Srimal RC, Dhawan KN, Bhargava KP (1985) Effect of alcohols on the permeability of blood-brain barrier. *Pharmacol Res Commun* 17:85-93.

- Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Cruz-Arroyo SR, Pérez-Garzón M, Maldonado-Frías S (2006) Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide stimulates the phosphorylation of p44 and p42 MAP kinases through CD14 and TLR-4 receptor activation in human gingival fibroblasts. *Life Sci* 78:2577-2583.
- Halassa MM, Haydon PG (2010) Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol* 72:335-355.
- Hamilton NB, Attwell D, Hall CN (2010) Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics* 2.
- Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Kang SS (2005) Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol Cells* 20:189-195.
- Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, Miller DW, Persidsky Y (2005a) Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin Exp Res* 29:999-1009.
- Haorah J, Knipe B, Gorantla S, Zheng J, Persidsky Y (2007) Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *J Neurochem* 100:324-336.
- Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y (2005b) Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol* 78:1223-1232.
- Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y (2008a) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 45:1542-1550.
- Haorah J, Schall K, Ramirez SH, Persidsky Y (2008) Activation of protein tyrosine kinases and matrix metalloproteinases causes blood-brain barrier injury: Novel mechanism for neurodegeneration associated with alcohol abuse. *Glia* 56:78-88.
- Hartmann C, Zozulya A, Wegener J, Galla HJ (2007) The impact of glia-derived extracellular matrices on the barrier function of cerebral endothelial cells: an in vitro study. *Exp Cell Res* 313:1318-1325.
- Hartz AM, Bauer B, Block ML, Hong JS, Miller DS (2008) Diesel exhaust particles induce oxidative stress, proinflammatory signaling, and P-glycoprotein up-regulation at the blood-brain barrier. *FASEB J* 22:2723-2733.
- Haseloff RF, Blasig IE, Bauer HC, Bauer H (2005) In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol* 25:25-39.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- Hawkins BT, Davis TP (2005) The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185.

- He ZW, Qin YH, Wang ZW, Chen Y, Shen Q, Dai SM (2013) HMGB1 acts in synergy with lipopolysaccharide in activating rheumatoid synovial fibroblasts via p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Mediators Inflamm* 2013:596716.
- Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.
- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624-633.
- Hermann DM, Bassetti CL (2007) Implications of ATP-binding cassette transporters for brain pharmacotherapies. *Trends Pharmacol Sci* 28:128-134.
- Hermann DM, Kilic E, Spudich A, Krämer SD, Wunderli-Allenspach H, Bassetti CL (2006) Role of drug efflux carriers in the healthy and diseased brain. *Ann Neurol* 60:489-498.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M (2004) AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117:5965-5973.
- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* 6:186.
- Himeda, T., et al., 2006. Time dependent alterations of co-localization of S100beta and GFAP in the MPTP-treated mice. *J Neural Transm.* 113, 1887-94.
- Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon JM (2001) Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 276:10423-10431.
- Hoffman PL, Rabe CS, Moses F, Tabakoff B (1989) N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production. *J Neurochem* 52:1937-1940.
- Hoirisch-Clapauch S, Nardi AE (2013) Multiple roles of tissue plasminogen activator in schizophrenia pathophysiology. *Semin Thromb Hemost* 39:950-954.
- Holstein SE, Spanos M, Hodge CW (2011) Adolescent C57BL/6J mice show elevated alcohol intake, but reduced taste aversion, as compared to adult mice: a potential behavioral mechanism for binge drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 35:1842-1851.
- Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wähämaa H, Schierbeck H, Aveberger AC, Klevenvall L, Palmblad K, Ottosson L, Andersson U, Harris HE (2009) The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 86:655-662.
- Hsieh HL, Chi PL, Lin CC, Yang CC, Yang CM (2014) Up-regulation of ROS-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 from High-Glucose-Challenged Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis. *Mol Neurobiol.*
- Hunsaker MR, Kesner RP (2008) Evaluating the differential roles of the dorsal dentate gyrus, dorsal CA3, and dorsal CA1 during a temporal ordering for spatial locations task. *Hippocampus* 18:955-964.

Iadecola C, Gorelick PB (2004) Hypertension, angiotensin, and stroke: beyond blood pressure. *Stroke* 35:348-350.

Iadecola C, Nedergaard M (2007) Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci* 10:1369-1376.

Ichinose A, Takio K, Fujikawa K (1986) Localization of the binding site of tissue-type plasminogen activator to fibrin. *J Clin Invest* 78:163-169.

Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I (2003) Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci Lett* 349:201-205.

Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskva V, Hörster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056-1060.

Iłzecka J (1996) The structure and function of blood-brain barrier in ischaemic brain stroke process. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska Med* 51:123-127.

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

Iwamura C, Nakayama T (2008) Toll-like receptors in the respiratory system: their roles in inflammation. *Curr Allergy Asthma Rep* 8:7-13.

Izco M, Orio L, O'Shea E, Colado MI (2007) Binge ethanol administration enhances the MDMA-induced long-term 5-HT neurotoxicity in rat brain. *Psychopharmacology (Berl)* 189:459-470.

Izumi Y, Kitabayashi R, Funatsu M, Izumi M, Yuede C, Hartman RE, Wozniak DF, Zorumski CF (2005a) A single day of ethanol exposure during development has persistent effects on bi-directional plasticity, N-methyl-D-aspartate receptor function and ethanol sensitivity. *Neuroscience* 136:269-279.

Izumi Y, Nagashima K, Murayama K, Zorumski CF (2005b) Acute effects of ethanol on hippocampal long-term potentiation and long-term depression are mediated by different mechanisms. *Neuroscience* 136:509-517.

Jacewicz M, Czapski GA, Katkowska I, Strosznajder RP (2009) Systemic administration of lipopolysaccharide impairs glutathione redox state and object recognition in male mice. The effect of PARP-1 inhibitor. *Folia Neuropathol* 47:321-328.

Janzer RC, Raff MC (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325:253-257.

Jarrard LE, Elmes DG (1982) Role of retroactive interference in the spatial memory of normal rats and rats with hippocampal lesions. *J Comp Physiol Psychol* 96:699-711.

Jedema HP, Carter MD, Dugan BP, Gurnsey K, Olsen AS, Bradberry CW (2011) The acute impact of ethanol on cognitive performance in rhesus macaques. *Cereb Cortex* 21:1783-1791.

- Jeong SM, Hahm KD, Shin JW, Leem JG, Lee C, Han SM (2006) Changes in magnesium concentration in the serum and cerebrospinal fluid of neuropathic rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 50:211-216.
- Johansson S, Fuchs A, Okvist A, Karimi M, Harper C, Garrick T, Sheedy D, Hurd Y, Bakalkin G, Ekström TJ (2007) Validation of endogenous controls for quantitative gene expression analysis: application on brain cortices of human chronic alcoholics. *Brain Res* 1132:20-28.
- Kaisho T, Akira S (2006) Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 117:979-987; quiz 988.
- Kalant H, Lê AD (1983) Effects of ethanol on thermoregulation. *Pharmacol Ther* 23:313-364.
- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3:422-433.
- Karin M, Liu Z, Zandi E (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246.
- Karwacka H (1980) Ultrastructural and biochemical studies of the brain and other organs in rats after chronic ethanol administration. II. Electronmicroscopic studies of rat brain after chronic ethanol administration. *Exp Pathol (Jena)* 18:127-135.
- Kaur S, Li J, Stenzel-Poore MP, Ryabinin AE (2012) Corticotropin-releasing factor acting on corticotropin-releasing factor receptor type 1 is critical for binge alcohol drinking in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 36:369-376.
- Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.
- Kawai T, Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 13:460-469.
- Kawai T, Akira S (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.
- Kehagia AA, Barker RA, Robbins TW (2010) Neuropsychological and clinical heterogeneity of cognitive impairment and dementia in patients with Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 9:1200-1213.
- Kelai S, Aïssi F, Lesch KP, Cohen-Salmon C, Hamon M, Lanfumey L (2003) Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice. *Alcohol Alcohol* 38:386-389.
- Kerschbaum HH, Hermann A (1997) Ethanol suppresses neuronal Ca²⁺ currents by effects on intracellular signal transduction. *Brain Res* 765:30-36.
- Kesner RP, Gilbert PE, Wallenstein GV (2000) Testing neural network models of memory with behavioral experiments. *Curr Opin Neurobiol* 10:260-265.
- Kesner RP, Hopkins RO (2001) Short-term memory for duration and distance in humans: role of the hippocampus. *Neuropsychology* 15:58-68.
- Kesner RP, Hunsaker MR, Gilbert PE (2005) The role of CA1 in the acquisition of an object-trace-odor paired associate task. *Behav Neurosci* 119:781-786.

- Kesner RP, Rolls ET (2001) Role of long-term synaptic modification in short-term memory. *Hippocampus* 11:240-250.
- Kieseier BC, Paul R, Koedel U, Seifert T, Clements JM, Gearing AJ, Pfister HW, Hartung HP (1999a) Differential expression of matrix metalloproteinases in bacterial meningitis. *Brain* 122 (Pt 8):1579-1587.
- Kieseier BC, Seifert T, Giovannoni G, Hartung HP (1999b) Matrix metalloproteinases in inflammatory demyelination: targets for treatment. *Neurology* 53:20-25.
- Kim EK, Choi EJ (2010) Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802:396-405.
- Kim JH, Yu YS, Kim DH, Kim KW (2009) Recruitment of pericytes and astrocytes is closely related to the formation of tight junction in developing retinal vessels. *J Neurosci Res* 87:653-659.
- Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S (2003) Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol* 201:319-327.
- Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG (1994) Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 218:325-329.
- Kleven M, Ybema C, Carilla E, Hamon M, Koek W (1995) Modification of behavioral effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin following chronic ethanol consumption in the rat: evidence for the involvement of 5-HT_{1A} receptors in ethanol dependence. *Eur J Pharmacol* 281:219-228.
- Kobori N, Clifton GL, Dash P (2002) Altered expression of novel genes in the cerebral cortex following experimental brain injury. *Brain Res Mol Brain Res* 104:148-158.
- Koelega HS (1995) Alcohol and vigilance performance: a review. *Psychopharmacology (Berl)* 118:233-249.
- Koob GF (1996) Drug addiction: the yin and yang of hedonic homeostasis. *Neuron* 16:893-896.
- Krueger M, Bechmann I (2010) CNS pericytes: concepts, misconceptions, and a way out. *Glia* 58:1-10.
- Krystosek A, Seeds NW (1986) Normal and malignant cells, including neurons, deposit plasminogen activator on the growth substrata. *Exp Cell Res* 166:31-46.
- Kuhnline Sloan CD, Nandi P, Linz TH, Aldrich JV, Audus KL, Lunte SM (2012) Analytical and biological methods for probing the blood-brain barrier. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)* 5:505-531.
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 7:97.
- Lancaster FE, Brown TD, Coker KL, Elliott JA, Wren SB (1996) Sex differences in alcohol preference and drinking patterns emerge during the early postpubertal period. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1043-1049.
- Lau AH, Frye GD (1996) Acute and chronic actions of ethanol on CA1 hippocampal responses to serotonin. *Brain Res* 731:12-20.

- Lee G, Schlichter L, Bendayan M, Bendayan R (2001) Functional expression of P-glycoprotein in rat brain microglia. *J Pharmacol Exp Ther* 299:204-212.
- Lee I, Hunsaker MR, Kesner RP (2005) The role of hippocampal subregions in detecting spatial novelty. *Behav Neurosci* 119:145-153.
- Lee J, Auyeung WW, Mattson MP (2003) Interactive effects of excitotoxic injury and dietary restriction on microgliosis and neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neuromolecular Med* 4:179-196.
- Leopold D (1990) [Cause of death in severe acute ethanol intoxication]. *Beitr Gerichtl Med* 48:163-167.
- Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* 204:216-237.
- Leventopoulos M, Rüedi-Bettschen D, Knuesel I, Feldon J, Pryce CR, Opacka-Juffry J (2007) Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain Res* 1142:119-126.
- Li JS, Chao YS (2008) Electrolytic lesions of dorsal CA3 impair episodic-like memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 89:192-198.
- Lieber CS (1977) The metabolic basis of alcohol's toxicity. *Hosp Pract* 12:73-80.
- Lien E, Chow JC, Hawkins LD, McGuinness PD, Miyake K, Espevik T, Gusovsky F, Golenbock DT (2001) A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway. *J Biol Chem* 276:1873-1880.
- Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT (2000) Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J Clin Invest* 105:497-504.
- Lin CC, Hsieh HL, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Chen JC, Yang CM (2012) NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species signal contributes to bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression and cell migration in brain astrocytes. *Cell Commun Signal* 10:35.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443:787-795.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, van der Valk P, Kappos L, Leppert D (2001) The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 124:1743-1753.
- Lindersson EK, Højrup P, Gai WP, Locker D, Martin D, Jensen PH (2004) alpha-Synuclein filaments bind the transcriptional regulator HMGB-1. *Neuroreport* 15:2735-2739.
- Liu W, Thielen RJ, McBride WJ (2006) Effects of repeated daily treatments with a 5-HT3 receptor antagonist on dopamine neurotransmission and functional activity of 5-HT3 receptors within the nucleus accumbens of Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 84:370-377.
- Liu Y, Stack SM, Lakka SS, Khan AJ, Woodley DT, Rao JS, Rao CN (1999) Matrix localization of tissue factor pathway inhibitor-2/matrix-associated serine protease inhibitor (TFPI-2/MSPI) involves arginine-

mediated ionic interactions with heparin and dermatan sulfate: heparin accelerates the activity of TFPI-2/MSPI toward plasmin. *Arch Biochem Biophys* 370:112-118.

Löscher W, Potschka H (2005a) Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters. *Nat Rev Neurosci* 6:591-602.

Löscher W, Potschka H (2005b) Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol* 76:22-76.

Lotze MT, Tracey KJ (2005) High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 5:331-342.

Lovinger DM, Roberto M (2013) Synaptic effects induced by alcohol. *Curr Top Behav Neurosci* 13:31-86.

Lovinger DM, White G, Weight FF (1989) Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* 243:1721-1724.

Lowery, E. G., et al., 2010. CRF-1 antagonist and CRF-2 agonist decrease binge-like ethanol drinking in C57BL/6J mice independent of the HPA axis. *Neuropsychopharmacology*. 35, 1241-52.

Lowery-Gionta EG, Navarro M, Li C, Pleil KE, Rinker JA, Cox BR, Sprow GM, Kash TL, Thiele TE (2012) Corticotropin releasing factor signaling in the central amygdala is recruited during binge-like ethanol consumption in C57BL/6J mice. *J Neurosci* 32:3405-3413.

Lu CY, Lai SC (2013) Matrix metalloproteinase-2 and -9 lead to fibronectin degradation in astroglia infected with *Toxoplasma gondii*. *Acta Trop* 125:320-329.

Lyons AM, Lowery EG, Sparta DR, Thiele TE (2008) Effects of food availability and administration of orexigenic and anorectic agents on elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. *Alcohol Clin Exp Res* 32:1962-1968.

Lyons, A. M., et al., 2008. Effects of food availability and administration of orexigenic and anorectic agents on elevated ethanol drinking associated with drinking in the dark procedures. *Alcohol Clin Exp Res*. 32, 1962-8.

Madamba SG, Hsu M, Schweitzer P, Siggins GR (1995) Ethanol enhances muscarinic cholinergic neurotransmission in rat hippocampus in vitro. *Brain Res* 685:21-32.

Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44:5-21.

Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM (2007) Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. *Brain Pathol* 17:243-250.

Maracchioni A, Totaro A, Angelini DF, Di Penta A, Bernardi G, Carrì MT, Achsel T (2007) Mitochondrial damage modulates alternative splicing in neuronal cells: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 100:142-153.

Maracchioni A, Totaro A, Angelini DF, Di Penta A, Bernardi G, Carrì MT, Achsel T (2007) Mitochondrial damage modulates alternative splicing in neuronal cells: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 100:142-153.

- Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, Rossetti C, Molteni M, Casalgrandi M, Manfredi AA, Bianchi ME, Vezzani A (2010) Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. *Nat Med* 16:413-419.
- Marra LE, Zhang ZX, Joe B, Campbell J, Levy GA, Penninger J, Zhang L (2004) IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha. *J Immunol* 172:1028-1035.
- Marshall SA, McClain JA, Kelso ML, Hopkins DM, Pauly JR, Nixon K (2013) Microglial activation is not equivalent to neuroinflammation in alcohol-induced neurodegeneration: The importance of microglia phenotype. *Neurobiol Dis* 54:239-251.
- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23:649-711.
- Martínez SE, Vaglenova J, Sabrià J, Martínez MC, Farrés J, Parés X (2001) Distribution of alcohol dehydrogenase mRNA in the rat central nervous system. Consequences for brain ethanol and retinoid metabolism. *Eur J Biochem* 268:5045-5056.
- Martínez-Mir A, Paloma E, Allikmets R, Ayuso C, del Rio T, Dean M, Vilageliu L, González-Duarte R, Balcells S (1998) Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. *Nat Genet* 18:11-12.
- Mascia MP, Machu TK, Harris RA (1996) Enhancement of homomeric glycine receptor function by long-chain alcohols and anaesthetics. *Br J Pharmacol* 119:1331-1336.
- Matsuguchi T, Masuda A, Sugimoto K, Nagai Y, Yoshikai Y (2003) JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *EMBO J* 22:4455-4464.
- Matthews DB, Silvers JR (2004) The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems. *Neurobiol Learn Mem* 82:299-308.
- Maylor EA, Rabbitt PM (1993) Alcohol, reaction time and memory: a meta-analysis. *Br J Psychol* 84 (Pt 3):301-317.
- McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 109 (Pt 9):2287-2298.
- McClain CJ, Mokshagundam SP, Barve SS, Song Z, Hill DB, Chen T, Deaciuc I (2004) Mechanisms of non-alcoholic steatohepatitis. *Alcohol* 34:67-79.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Middaugh LD, Szumlinski KK, Van Patten Y, Marlowe AL, Kalivas PW (2003) Chronic ethanol consumption by C57BL/6 mice promotes tolerance to its interoceptive cues and increases extracellular dopamine, an effect blocked by naltrexone. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1892-1900.

- Mihic SJ, Harris RA (1996) Inhibition of rho1 receptor GABAergic currents by alcohols and volatile anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 277:411-416.
- Millar K, Hammersley RH, Finnigan F (1992) Reduction of alcohol-induced performance impairment by prior ingestion of food. *Br J Psychol* 83 (Pt 2):261-278.
- Miller FN, Sims DE (1986) Contractile elements in the regulation of macromolecular permeability. *Fed Proc* 45:84-88.
- Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Butler S, Witztum JL (2005) Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1213-1219.
- Min KJ, Yang MS, Kim SU, Jou I, Joe EH (2006) Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J Neurosci* 26:1880-1887.
- Minagar A, Alexander JS (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9:540-549.
- Mishra BB, Mishra PK, Teale JM (2006) Expression and distribution of Toll-like receptors in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroimmunol* 181:46-56.
- Mitchell V, Prévot V, Beauvillain JC (1998) Distribution and diurnal variations of the mu opioid receptor expression in the arcuate nucleus of the male rat. *Neuroendocrinology* 67:94-100.
- Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J (2001b) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 32:2762-2767.
- Moore EM, Mariani JN, Linsenbardt DN, Melón LC, Boehm SL (2010) Adolescent C57BL/6J (but not DBA/2J) mice consume greater amounts of limited-access ethanol compared to adults and display continued elevated ethanol intake into adulthood. *Alcohol Clin Exp Res* 34:734-742.
- Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, Staddon JM (2007) Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 147:664-673.
- Morgan PF, Nadi NS, Karanian J, Linnoila M (1992) Mapping rat brain structures activated during ethanol withdrawal: role of glutamate and NMDA receptors. *Eur J Pharmacol* 225:217-223.
- Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T (2002) Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8:101-105.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274:R1203-1211.

- Nadal A, Fuentes E, Pastor J, McNaughton PA (1995) Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1426-1430.
- Nadel L (1991) The hippocampus and space revisited. *Hippocampus* 1:221-229.
- Nagase H, Visse R, Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69:562-573.
- Nagata K, Aistrup GL, Huang CS, Marszalec W, Song JH, Yeh JZ, Narahashi T (1996) Potent modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptor-channel by ethanol. *Neurosci Lett* 217:189-193.
- Naranjo CA, Bremner KE (1993) Behavioural correlates of alcohol intoxication. *Addiction* 88:25-35.
- Nelson EJ, Hellevuo K, Yoshimura M, Tabakoff B (2003) Ethanol-induced phosphorylation and potentiation of the activity of type 7 adenylyl cyclase. Involvement of protein kinase C delta. *J Biol Chem* 278:4552-4560.
- Neria F, del Carmen Serrano-Perez M, Velasco P, Urso K, Tranque P, Cano E (2013) NFATc3 promotes Ca(2+) -dependent MMP3 expression in astroglial cells. *Glia* 61:1052-1066.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653-660.
- Nomura M, Takihara Y, Shimada K (1994) Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: one of the early inducible clones encodes a novel protein sharing several highly homologous regions with a *Drosophila* polyhomeotic protein. *Differentiation* 57:39-50.
- Nwaozuzu OM, Sellers LA, Barrand MA (2003) Signalling pathways influencing basal and H₂O₂-induced P-glycoprotein expression in endothelial cells derived from the blood-brain barrier. *J Neurochem* 87:1043-1051.
- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG, Ransom BR, Goldman SA, Nedergaard M (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29:3276-3287.
- O'Connor KA, Hansen MK, Rachal Pugh C, Deak MM, Biedenkapp JC, Milligan ED, Johnson JD, Wang H, Maier SF, Tracey KJ, Watkins LR (2003) Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. *Cytokine* 24:254-265.
- Ogden EJ, Moskowitz H (2004) Effects of alcohol and other drugs on driver performance. *Traffic Inj Prev* 5:185-198.
- Oh JH, Kim JH, Ahn HJ, Yoon JH, Yoo SC, Choi DS, Lee IS, Ryu HS, Min CK (2009) Syndecan-1 enhances the endometrial cancer invasion by modulating matrix metalloproteinase-9 expression through nuclear factor kappaB. *Gynecol Oncol* 114:509-515.
- Oh YJ, Youn JH, Ji Y, Lee SE, Lim KJ, Choi JE, Shin JS (2009) HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J Immunol* 182:5800-5809.

- Ohtsuki S, Terasaki T (2007) Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* 24:1745-1758.
- Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP (2011) Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. *Trends Neurosci* 34:269-281.
- Oldendorf WH (1977) The blood-brain barrier. *Exp Eye Res* 25 Suppl:177-190. -
- Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW (2001) Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *J Neurosci* 21:RC184. -
- Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, Roth KA (2002) Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis* 9:205-219. -
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173:3916-3924. -
- Orlowski S, Martin S, Escargueil A (2006) P-glycoprotein and 'lipid rafts': some ambiguous mutual relationships (floating on them, building them or meeting them by chance?). *Cell Mol Life Sci* 63:1038-1059.
- Osculati F, Sbarbati A, Bertini M, Deganello A, Gaburro D (1995) Ghosts in the stomach: may dead cells protect living ones. *Gastroenterology* 108:304-305. -
- Oslin DW, Cary MS (2003) Alcohol-related dementia: validation of diagnostic criteria. *Am J Geriatr Psychiatry* 11:441-447. -
- Packard MG, Hirsh R, White NM (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *J Neurosci* 9:1465-1472.
- Palmer AM (2010) The blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37:1-2. -
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737. -
- Pardridge WM (2001) Brain drug targeting and gene technologies. *Jpn J Pharmacol* 87:97-103. -
- Pardridge WM (2003) Blood-brain barrier genomics and the use of endogenous transporters to cause drug penetration into the brain. *Curr Opin Drug Discov Devel* 6:683-691. -
- Pardridge WM (2005) Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 30:57-70. -
- Pardridge WM (2006) Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Discov Med* 6:139-143. -
- Pardridge WM (2010) Biopharmaceutical drug targeting to the brain. *J Drug Target* 18:157-167. -
- Pardridge WM, Golden PL, Kang YS, Bickel U (1997) Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* 68:1278-1285. -

- Park HJ, Chung HJ, Min HY, Park EJ, Hong JY, Kim WB, Kim SH, Lee SK (2005) Inhibitory effect of DA-125, a new anthracyclin analog antitumor agent, on the invasion of human fibrosarcoma cells by down-regulating the matrix metalloproteinases. *Biochem Pharmacol* 71:21-31.
- Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, Sohn JW, Yamada S, Maruyama I, Banerjee A, Ishizaka A, Abraham E (2006) High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C917-924.
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E (2004) Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 279:7370-7377.
- Parkkinen J, Rauvala H (1991) Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J Biol Chem* 266:16730-16735.
- Pascual M, Blanco AM, Cauli O, Miñarro J, Guerri C (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci* 25:541-550.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443:700-704.
- Persidsky Y, Gendelman HE (2003) Mononuclear phagocyte immunity and the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J Leukoc Biol* 74:691-701.
- Persidsky Y, Heilman D, Haorah J, Zelivyanskaya M, Persidsky R, Weber GA, Shimokawa H, Kaibuchi K, Ikezu T (2006) Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across the blood-brain barrier in HIV-1 encephalitis (HIVE). *Blood* 107:4770-4780.
- Petersen DR (1983) Pharmacogenetic approaches to the neuropharmacology of ethanol. *Recent Dev Alcohol* 1:49-69.
- Peterson JB, Rothfleisch J, Zelazo PD, Pihl RO (1990) Acute alcohol intoxication and cognitive functioning. *J Stud Alcohol* 51:114-122.
- Phillips DE, Krueger SK, Wall KA, Smoyer-Dearing LH, Sikora AK (1997) The development of the blood-brain barrier in alcohol-exposed rats. *Alcohol* 14:333-343.
- Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269:15957-15960.
- Potula R, Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Chrastil J, Heilman D, Dou H, Reddy R, Ghorpade A, Persidsky Y (2006) Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune responses in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am J Pathol* 168:1335-1344.
- Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 5:10.

- Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, Salomone S, Moskowitz MA (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:927-938.
- Qiu Y, Yang J, Wang W, Zhao W, Peng F, Xiang Y, Chen G, Chen T, Chai C, Zheng S, Watkins DJ, Feng J (2014) HMGB1-promoted and TLR2/4-dependent NK cell maturation and activation take part in rotavirus-induced murine biliary atresia. *PLoS Pathog* 10:e1004011.
- Raskin NH, Sokoloff L (1972) Ethanol-induced adaptation of alcohol dehydrogenase activity in rat brain. *Nat New Biol* 236:138-140.
- Rauvala H, Rouhiainen A (2010) Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim Biophys Acta* 1799:164-170.
- Reddy BV, Boyadjieva N, Sarkar DK (1995) Effect of ethanol, propanol, butanol, and catalase enzyme blockers on beta-endorphin secretion from primary cultures of hypothalamic neurons: evidence for a mediatory role of acetaldehyde in ethanol stimulation of beta-endorphin release. *Alcohol Clin Exp Res* 19:339-344.
- Reese TS, Karnovsky MJ (1967) Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34:207-217.
- Reiber H (2001) Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 310:173-186.
- Reitz C, van Rooij FJ, Soares HD, de Maat MP, Hofman A, Witteman JC, Breteler MM (2010) Matrix metalloproteinase 3 haplotypes and plasma amyloid beta levels: the Rotterdam Study. *Neurobiol Aging* 31:715-718.
- Reynolds JN, Prasad A, MacDonald JF (1992) Ethanol modulation of GABA receptor-activated Cl⁻ currents in neurons of the chick, rat and mouse central nervous system. *Eur J Pharmacol* 224:173-181.
- Rhodes JS, Best K, Belknap JK, Finn DA, Crabbe JC (2005) Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav* 84:53-63.
- Rhodes JS, Ford MM, Yu CH, Brown LL, Finn DA, Garland T, Crabbe JC (2007) Mouse inbred strain differences in ethanol drinking to intoxication. *Genes Brain Behav* 6:1-18.
- Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A (2005) Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:27-42.
- Ristuccia RC, Spear LP (2004) Adolescent ethanol sensitivity: hypothermia and acute tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1021:445-447.
- Ritzmann RF, Tabakoff B (1976a) Body temperature in mice: a quantitative measure of alcohol tolerance and physical dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 199:158-170.
- Ritzmann RF, Tabakoff B (1976b) Ethanol, serotonin metabolism, and body temperature. *Ann N Y Acad Sci* 273:247-255.

- Roberto M, Cruz MT, Gilpin NW, Sabino V, Schweitzer P, Bajo M, Cottone P, Madamba SG, Stouffer DG, Zorrilla EP, Koob GF, Siggins GR, Parsons LH (2010) Corticotropin releasing factor-induced amygdala gamma-aminobutyric Acid release plays a key role in alcohol dependence. *Biol Psychiatry* 67:831-839.
- RODGERS DA, MCCLEARN GE (1964) SUCROSE VERSUS ETHANOL APPETITE IN INBRED STRAINS OF MICE. *Q J Stud Alcohol* 25:26-35.
- Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S (2012) West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases. *J Gen Virol* 93:1193-1203.
- Rolls ET (2006) Neurophysiological and computational analyses of the primate presubiculum, subiculum and related areas. *Behav Brain Res* 174:289-303.
- Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-291.
- Rosenberg GA (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 8:205-216.
- Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360-366.
- Ros-Simó C, Ruiz-Medina J, Valverde O (2012) Behavioural and neuroinflammatory effects of the combination of binge ethanol and MDMA in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 221:511-525.
- Rothermundt M, Peters M, Prehn JH, Arolt V (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc Res Tech* 60:614-632.
- Rout UK (1992) Alcohol dehydrogenases in the brain of mice. *Alcohol Clin Exp Res* 16:286-289.
- Roy A, Pandey SC (2002) The decreased cellular expression of neuropeptide Y protein in rat brain structures during ethanol withdrawal after chronic ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 26:796-803.
- Ruan W, Long H, Vuong DH, Rao Y (2002) Bifocal is a downstream target of the Ste20-like serine/threonine kinase misshapen in regulating photoreceptor growth cone targeting in *Drosophila*. *Neuron* 36:831-842.
- Rubio-Araiz A, Perez-Hernandez M, Urrutia A, Porcu F, Borcel E, Gutierrez-Lopez MD, O'Shea E, Colado MI (2014) 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X7 receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-13.
- Ryabiniin AE (1998) Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology (Berl)* 139:34-43.
- Ryabiniin AE, Galvan-Rosas A, Bachtell RK, Risinger FO (2003) High alcohol/sucrose consumption during dark circadian phase in C57BL/6J mice: involvement of hippocampus, lateral septum and urocortin-positive cells of the Edinger-Westphal nucleus. *Psychopharmacology (Berl)* 165:296-305.
- Sabroe I, Whyte MK (2007) Toll-like receptor (TLR)-based networks regulate neutrophilic inflammation in respiratory disease. *Biochem Soc Trans* 35:1492-1495.

- Sadrian B, Subbanna S, Wilson DA, Basavarajappa BS, Saito M (2012) Lithium prevents long-term neural and behavioral pathology induced by early alcohol exposure. *Neuroscience* 206:122-135.
- Saito M, Chakraborty G, Shah R, Mao RF, Kumar A, Yang DS, Dobrenis K (2012) Elevation of GM2 ganglioside during ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *J Neurochem* 121:649-661.
- Saleena LM, Loganathan P, Rangarajan S, Nair S (2001) Genetic diversity of Bradyrhizobium strains isolated from *Arachis hypogaea*. *Can J Microbiol* 47:118-122.
- Salo, J., et al., 2008. Plasmin-matrix metalloproteinase cascades in spinal response to an experimental disc lesion in pig. *Spine (Phila Pa 1976)*. 33, 839-44.
- Savarin C, Stohlman SA, Rietsch AM, Butchi N, Ransohoff RM, Bergmann CC (2011) MMP9 deficiency does not decrease blood-brain barrier disruption, but increases astrocyte MMP3 expression during viral encephalomyelitis. *Glia* 59:1770-1781.
- Savarin, C., et al., 2011. MMP9 deficiency does not decrease blood-brain barrier disruption, but increases astrocyte MMP3 expression during viral encephalomyelitis. *Glia*. 59, 1770-81.
- Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME (2002) Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418:191-195.
- Schmued LC, Albertson C, Slikker W (1997) Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751:37-46.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874:123-130.
- Schmued, L. C., et al., 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res*. 751, 37-46.
- Schroeter ML, Abdul-Khaliq H, Diefenbacher A, Blasig IE (2002) S100B is increased in mood disorders and may be reduced by antidepressive treatment. *Neuroreport* 13:1675-1678.
- Schweizer TA, Vogel-Sprott M (2008) Alcohol-impaired speed and accuracy of cognitive functions: a review of acute tolerance and recovery of cognitive performance. *Exp Clin Psychopharmacol* 16:240-250.
- SCOVILLE WB, MILNER B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11-21.
- Sedlakova R, Shivers RR, Del Maestro RF (1999) Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol* 31:149-161.
- Seegers U, Potschka H, Löscher W (2002) Transient increase of P-glycoprotein expression in endothelium and parenchyma of limbic brain regions in the kainate model of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 51:257-268.

- Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E (2008) HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol* 180:2531-2537.
- Shanley TP, Vasi N, Denenberg A, Wong HR (2001) The serine/threonine phosphatase, PP2A: endogenous regulator of inflammatory cell signaling. *J Immunol* 166:966-972.
- Sharom FJ, Lugo MR, Eckford PD (2005) New insights into the drug binding, transport and lipid flippase activities of the p-glycoprotein multidrug transporter. *J Bioenerg Biomembr* 37:481-487.
- Sharpe AL, Tsivkovskaia NO, Ryabinin AE (2005) Ataxia and c-Fos expression in mice drinking ethanol in a limited access session. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1419-1426.
- Shiia N, Kuniyama T, Miyatake T, Matsuzaki K, Yasuda K (2004) Tau protein in the cerebrospinal fluid is a marker of brain injury after aortic surgery. *Ann Thorac Surg* 77:2034-2038.
- Skrzypiec AE, Maiya R, Chen Z, Pawlak R, Strickland S (2009) Plasmin-mediated degradation of laminin gamma-1 is critical for ethanol-induced neurodegeneration. *Biol Psychiatry* 66:785-794.
- Smith-Knapp K, Corrigan JD, Arnett JA (1996) Predicting functional independence from neuropsychological tests following traumatic brain injury. *Brain Inj* 10:651-661.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005) Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38:73-83.
- Solem M, McMahon T, Messing RO (1997) Protein kinase A regulates inhibition of N- and P/Q-type calcium channels by ethanol in PC12 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1487-1495.
- Soontornmalai A, Vlaming ML, Fritschy JM (2006) Differential, strain-specific cellular and subcellular distribution of multidrug transporters in murine choroid plexus and blood-brain barrier. *Neuroscience* 138:159-169.
- Sorokin L (2010) The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol* 10:712-723.
- Sparrow AM, Lowery-Gionta EG, Pleil KE, Li C, Sprow GM, Cox BR, Rinker JA, Jijon AM, Peña J, Navarro M, Kash TL, Thiele TE (2012) Central neuropeptide Y modulates binge-like ethanol drinking in C57BL/6J mice via Y1 and Y2 receptors. *Neuropsychopharmacology* 37:1409-1421.
- Spear L (2000) Modeling adolescent development and alcohol use in animals. *Alcohol Res Health* 24:115-123.
- Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE (1990) Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:364-368.
- Sprow GM, Thiele TE (2012) The neurobiology of binge-like ethanol drinking: evidence from rodent models. *Physiol Behav* 106:325-331.
- Stamatovic SM, Shaku P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:593-606.

- Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nüsslein-Volhard C (1991) The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65:725-735.
- Steinberg L (2008) A Social Neuroscience Perspective on Adolescent Risk-Taking. *Dev Rev* 28:78-106.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.
- Stewart PA, Hayakawa EM, Carlen PL (1988) Ethanol and pentobarbital in combination increase blood-brain barrier permeability to horseradish peroxidase. *Brain Res* 443:12-20.
- Streuli C (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 11:634-640.
- Stros M, Ozaki T, Bacikova A, Kageyama H, Nakagawara A (2002) HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem* 277:7157-7164.
- Subbanna S, Nagre NN, Shivakumar M, Umapathy NS, Psychoyos D, Basavarajappa BS (2014) Ethanol induced acetylation of histone at G9a exon1 and G9a-mediated histone H3 dimethylation leads to neurodegeneration in neonatal mice. *Neuroscience* 258:422-432.
- Subbanna S, Shivakumar M, Psychoyos D, Xie S, Basavarajappa BS (2013a) Anandamide-CB1 receptor signaling contributes to postnatal ethanol-induced neonatal neurodegeneration, adult synaptic, and memory deficits. *J Neurosci* 33:6350-6366.
- Subbanna S, Shivakumar M, Umapathy NS, Saito M, Mohan PS, Kumar A, Nixon RA, Verin AD, Psychoyos D, Basavarajappa BS (2013b) G9a-mediated histone methylation regulates ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal mouse brain. *Neurobiol Dis* 54:475-485.
- Summerfield SG, Read K, Begley DJ, Obradovic T, Hidalgo IJ, Coggon S, Lewis AV, Porter RA, Jeffrey P (2007) Central nervous system drug disposition: the relationship between in situ brain permeability and brain free fraction. *J Pharmacol Exp Ther* 322:205-213.
- Sutmuller R, Garritsen A, Adema GJ (2007) Regulatory T cells and toll-like receptors: regulating the regulators. *Ann Rheum Dis* 66 Suppl 3:iii91-95.
- Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L (2002) Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22:920-930.
- Szumliński KK, Lominac KD, Oleson EB, Walker JK, Mason A, Dehoff MH, Klugmann M, Klugman M, Cagle S, Welt K, Doring M, Worley PF, Middaugh LD, Kalivas PW (2005) Homer2 is necessary for EtOH-induced neuroplasticity. *J Neurosci* 25:7054-7061.
- Tabakoff B, Anderson RA, Ritzmann RF (1976) Brain acetaldehyde after ethanol administration. *Biochem Pharmacol* 25:1305-1309.

- Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, Monsaingeon M, Bale TL, Culler MD, Datta R, Drago F, Vale WW, Koob GF, Zorrilla EP, Contarino A (2007) Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci* 26:2303-2314.
- Tabengwa EM, Wheeler CG, Yancey DA, Grenett HE, Booyse FM (2002) Alcohol-induced up-regulation of fibrinolytic activity and plasminogen activators in human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1121-1127.
- Takano T, Tian GF, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nat Neurosci* 9:260-267.
- Takeda K, Akira S (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 34:73-82.
- Tanaka H, Ikai E, Yamada Y (1997) Genetic polymorphisms in alcohol metabolizing enzymes as related to sensitivity to alcohol-induced health effects. *Environ Health Prev Med* 1:193-200.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13798-13803.
- Tarr AJ, McLinden KA, Kranjac D, Kohman RA, Amaral W, Boehm GW (2011) The effects of age on lipopolysaccharide-induced cognitive deficits and interleukin-1 β expression. *Behav Brain Res* 217:481-485.
- Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL (2000) Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10520-10525.
- Terrando N, Rei Fidalgo A, Vizcaychipi M, Cibelli M, Ma D, Monaco C, Feldmann M, Maze M (2010) The impact of IL-1 modulation on the development of lipopolysaccharide-induced cognitive dysfunction. *Crit Care* 14:R88.
- Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH (2011) Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mater* 27:926-933.
- Thanabalasundaram G, Pieper C, Lischper M, Galla HJ (2010) Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res* 1347:1-10.
- Thiele TE (2012) Commentary: studies on binge-like ethanol drinking may help to identify the neurobiological mechanisms underlying the transition to dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 36:193-196.
- Tilling T, Korte D, Hoheisel D, Galla HJ (1998) Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J Neurochem* 71:1151-1157.
- Tramontina F, Tramontina AC, Souza DF, Leite MC, Gottfried C, Souza DO, Wofchuk ST, Gonçalves CA (2006) Glutamate uptake is stimulated by extracellular S100B in hippocampal astrocytes. *Cell Mol Neurobiol* 26:81-86.

Turner NA, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE (2010) Modulatory effect of interleukin-1 α on expression of structural matrix proteins, MMPs and TIMPs in human cardiac myofibroblasts: role of p38 MAP kinase. *Matrix Biol* 29:613-620.

Ueno M (2009) Mechanisms of the penetration of blood-borne substances into the brain. *Curr Neuropharmacol* 7:142-149.

Ueno Y, Fukunaga T, Mizoi Y, Adachi J, Fujiwara S (1990) A pharmacokinetic study of ethanol elimination--first pass metabolism and elimination rate. *Arukuru Kenkyuto Yakubutsu Ison* 25:103-115.

Ullah N, Naseer MI, Ullah I, Kim TH, Lee HY, Kim MO (2013) Neuroprotective profile of pyruvate against ethanol-induced neurodegeneration in developing mice brain. *Neurol Sci* 34:2137-2143.

Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291:657-661.

Urrutia A, Rubio-Araiz A, Gutierrez-Lopez MD, ElAli A, Hermann DM, O'Shea E, Colado MI (2013) A study on the effect of JNK inhibitor, SP600125, on the disruption of blood-brain barrier induced by methamphetamine. *Neurobiol Dis* 50:49-58.

Vallés SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 14:365-371.

Van Eldik LJ, Wainwright MS (2003) The Janus face of glial-derived S100B: beneficial and detrimental functions in the brain. *Restor Neurol Neurosci* 21:97-108.

Van Wart HE, Birkedal-Hansen H (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:5578-5582.

Varlinskaya EI, Doremus-Fitzwater TL, Spear LP (2010) Repeated restraint stress alters sensitivity to the social consequences of ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 96:228-235.

Verrijdt G, Haelens A, Schoenmakers E, Rombauts W, Claessens F (2002) Comparative analysis of the influence of the high-mobility group box 1 protein on DNA binding and transcriptional activation by the androgen, glucocorticoid, progesterone and mineralocorticoid receptors. *Biochem J* 361:97-103.

Vidal L, Lugo N (2006) Changes in neuropeptide Y immunoreactivity and transcript levels in circadian system structures of the diurnal rodent, the thirteen-lined ground squirrel. *Brain Res* 1125:77-84.

Visse R, Nagase H (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839.

Vogelgesang S, Warzok RW, Cascorbi I, Kunert-Keil C, Schroeder E, Kroemer HK, Siegmund W, Walker LC, Pahnke J (2004) The role of P-glycoprotein in cerebral amyloid angiopathy; implications for the early pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 1:121-125.

Volpicelli JR, Davis MA, Olgin JE (1986) Naltrexone blocks the post-shock increase of ethanol consumption. *Life Sci* 38:841-847.

- Volz HC, Kaya Z, Katus HA, Andrassy M (2010) The role of HMGB1/RAGE in inflammatory cardiomyopathy. *Semin Thromb Hemost* 36:185-194.
- Walker BM, Walker JL, Ehlers CL (2008) Dissociable effects of ethanol consumption during the light and dark phase in adolescent and adult Wistar rats. *Alcohol* 42:83-89.
- Walker DW, Freund G (1971) Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiol Behav* 7:773-778.
- Wang FQ, Ariztia EV, Boyd LR, Horton FR, Smicun Y, Hetherington JA, Smith PJ, Fishman DA (2010) Lysophosphatidic acid (LPA) effects on endometrial carcinoma in vitro proliferation, invasion, and matrix metalloproteinase activity. *Gynecol Oncol* 117:88-95.
- Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, Zhang M, Ombrellino M, Sama A, Tracey KJ (1999) Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. *Surgery* 126:389-392.
- Wang Q, Beck WT (1998) Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res* 58:5762-5769.
- Wang X, Stridh L, Li W, Dean J, Elmgren A, Gan L, Eriksson K, Hagberg H, Mallard C (2009) Lipopolysaccharide sensitizes neonatal hypoxic-ischemic brain injury in a MyD88-dependent manner. *J Immunol* 183:7471-7477.
- Wang Y, Jeng CH, Lin JC, Wang JY (1996) Serotonin modulates ethanol-induced depression in cerebellar Purkinje neurons. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1229-1236.
- Wang Y, Zhang J, Yi XJ, Yu FS (2004) Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells. *Exp Eye Res* 78:125-136.
- Wang Z, Woolverton WL (2007) Estimating the relative reinforcing strength of (+/-)-3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its isomers in rhesus monkeys: comparison to (+)-methamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 189:483-488.
- Weissenborn R, Duka T (2003) Acute alcohol effects on cognitive function in social drinkers: their relationship to drinking habits. *Psychopharmacology (Berl)* 165:306-312.
- Wester AE, Verster JC, Volkerts ER, Böcker KB, Kenemans JL (2010) Effects of alcohol on attention orienting and dual-task performance during simulated driving: an event-related potential study. *J Psychopharmacol* 24:1333-1348.
- White AM (2003) What happened? Alcohol, memory blackouts, and the brain. *Alcohol Res Health* 27:186-196.
- Wijnholds J, deLange EC, Scheffer GL, van den Berg DJ, Mol CA, van der Valk M, Schinkel AH, Scheper RJ, Breimer DD, Borst P (2000) Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Clin Invest* 105:279-285.

- Wijnholds J, Evers R, van Leusden MR, Mol CA, Zaman GJ, Mayer U, Beijnen JH, van der Valk M, Krimpenfort P, Borst P (1997) Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. *Nat Med* 3:1275-1279.
- Wilson DA, Peterson J, Basavaraj BS, Saito M (2011) Local and regional network function in behaviorally relevant cortical circuits of adult mice following postnatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 35:1974-1984.
- Winkler EA, Bell RD, Zlokovic BV (2011) Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci* 14:1398-1405.
- Wolburg H, Lippoldt A (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38:323-337.
- Wright JW, Masino AJ, Reichert JR, Turner GD, Meighan SE, Meighan PC, Harding JW (2003) Ethanol-induced impairment of spatial memory and brain matrix metalloproteinases. *Brain Res* 963:252-261.
- Wu F, Nicholson AD, Haile WB, Torre E, An J, Chen C, Lee AK, Duong DM, Dammer EB, Seyfried NT, Tong FC, Votaw JR, Yepes M (2013) Tissue-type plasminogen activator mediates neuronal detection and adaptation to metabolic stress. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:1761-1769.
- Yakovleva T, Bazov I, Watanabe H, Hauser KF, Bakalkin G (2011) Transcriptional control of maladaptive and protective responses in alcoholics: a role of the NF- κ B system. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1:S29-38.
- Yang CM, Hsieh HL, Lin CC, Shih RH, Chi PL, Cheng SE, Hsiao LD (2013) Multiple factors from bradykinin-challenged astrocytes contribute to the neuronal apoptosis: involvement of astroglial ROS, MMP-9, and HO-1/CO system. *Mol Neurobiol* 47:1020-1033.
- Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, Wang H, Ochani M, Li J, Lu B, Chavan S, Rosas-Ballina M, Al-Abed Y, Akira S, Bierhaus A, Erlandsson-Harris H, Andersson U, Tracey KJ (2010) A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11942-11947.
- Ye Y, Wang G, Wang H, Wang X (2011) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) infusion restored astrocytic plasticity in the hippocampus of a rat model of depression. *Neurosci Lett* 503:15-19.
- Yokogawa K, Takahashi M, Tamai I, Konishi H, Nomura M, Moritani S, Miyamoto K, Tsuji A (1999) P-glycoprotein-dependent disposition kinetics of tacrolimus: studies in *mdr1a* knockout mice. *Pharm Res* 16:1213-1218.
- Yorulmaz H, Seker FB, Oztas B (2011) The effects of hypoglycemic and alcoholic coma on the blood-brain barrier permeability. *Bosn J Basic Med Sci* 11:108-112.
- Yoshimoto T, Nakanishi K (2006) Roles of IL-18 in basophils and mast cells. *Allergol Int* 55:105-113.
- Youn JH, Shin JS (2006) Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 177:7889-7897.

- Zenker D, Begley D, Bratzke H, Rübsamen-Waigmann H, von Briesen H (2003) Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J Physiol* 551:1023-1032.
- Zhang X, Kusumo H, Sakharkar AJ, Pandey SC, Guizzetti M (2014) Regulation of DNA methylation by ethanol induces tissue plasminogen activator expression in astrocytes. *J Neurochem* 128:344-349.
- Zhou J, Li J, Rosenbaum DM, Barone FC (2011) Thrombopoietin protects the brain and improves sensorimotor functions: reduction of stroke-induced MMP-9 upregulation and blood-brain barrier injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:924-933.
- Zhou J, Liu M, Aneja R, Chandra R, Lage H, Joshi HC (2006) Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer cells by the c-Jun NH2-terminal kinase. *Cancer Res* 66:445-452.
- Zhou J, Marten NW, Bergmann CC, Macklin WB, Hinton DR, Stohlman SA (2005) Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor during viral encephalitis. *J Virol* 79:4764-4773.
- Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM (2003) Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8. *J Biol Chem* 278:45406-45413.
- Zimatkin SM, Buben AL (2006) A novel method for evaluation of ethanol oxidation in living brain. *Bull Exp Biol Med* 142:382-385.
- Zimatkin SM, Pronko SP, Vasiliou V, Gonzalez FJ, Deitrich RA (2006) Enzymatic mechanisms of ethanol oxidation in the brain. *Alcohol Clin Exp Res* 30:1500-1505.
- Zlokovic BV (2008) The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57:178-201.
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.