



JUSTIFICACION DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN EN DROGODEPENDENCIAS

MEMORIA CIENTÍFICA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

1ª ANUALIDAD

2ª ANUALIDAD

3ª ANUALIDAD

FINAL

JUSTIFICACIÓN FINAL DE LA ANUALIDAD

Número Expediente: 2010/034

Investigador Principal: M^a Isabel Colado Megía

Otros Investigadores:

Esther O'Shea Gaya
M^a Dolores Gutierrez Lopez
Alejandro Higuera Matas
Noelia Granado Martínez
Ana Rubio Araiz
Andrea Mayado Colino
Andrés Urrutia Elorduy
Elisa Torres Lorite

Título Proyecto o subproyecto: Cambios inducidos por MDMA en la actividad de metaloproteinasas y en la integridad de la barrera hematoencefálica y su regulación por la exposición a dosis moderadas y altas de etanol. Estudios de neurotoxicidad.

Título Proyecto coordinado en el que se integra (Sólo en caso de ser un subproyecto)

Organismo: Universidad Complutense

Centro: Facultad Medicina

Departamento: Farmacología

Comunidad Autónoma: Madrid

Duración: 3 años

Fecha de inicio: 15-12-2010

Fecha de finalización: 15-12-2013, prorrogado hasta 15 Abril 2014

Año Convocatoria: 2010

Área Temática: 1. Valoración del daño cerebral producido por consumo de alcohol. 3. Investigaciones sobre determinantes biológicos y culturales del policonsumo de drogas.

Palabras Clave: MDMA, etanol, metanfetamina, barrera hematoencefálica, metaloproteinasas, hipertermia, citokinas.



RESUMEN: (Objetivo, ámbito de estudio, sujetos de estudio, instrumentalización, resultados, conclusiones. Máximo 2.000 palabras.)

La administración de MDMA produce cambios tempranos en las proteínas de unión estrecha de las células endoteliales y en la lámina basal de la matriz extracelular que comprometen la integridad de la BHE. Estos cambios permiten la deposición de proteínas plasmáticas en el parénquima cerebral. Estos efectos probablemente están causados por la hipertermia inmediata que induce la MDMA o también pueden ser producidos por un incremento en la liberación y actividad de las metaloproteinasas (MMPs) como consecuencia de la activación microglial que induce la droga. Como ocurre en otros modelos neuroinflamatorios, la alteración de la integridad de la BHE y el incremento en la actividad de las MMPs podría contribuir a la neurotoxicidad a largo plazo que induce la droga y que se manifiesta como una disminución de terminales nerviosos serotoninérgicos. El consumo de MDMA se produce en el contexto de un claro patrón de policonsumo de tal forma que los consumidores de éxtasis emplean otras sustancias con una frecuencia elevada, entre ellas destaca el etanol. Datos recientes de nuestro laboratorio indican que la exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma potencia la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la MDMA por un mecanismo que no se relaciona con cambios en la hipertermia aguda. Puesto que el etanol *per se* parece modificar la permeabilidad de la BHE parece razonable proponer que el aumento en la toxicidad de MDMA que produce el etanol fuera debido a la capacidad del alcohol de potenciar las alteraciones en la integridad de la BHE que pudiera ejercer la MDMA.

Consideramos pertinente desarrollar este proyecto porque proporcionará nueva información sobre los mecanismos moleculares implicados en la neurotoxicidad de MDMA (papel de las metaloproteinasas), el efecto de la droga sobre la permeabilidad de la BHE y la importancia de la integridad de la BHE en el efecto neurotóxico serotoninérgico a largo plazo. Además, aportará nueva información sobre las consecuencias derivadas de la combinación MDMA y etanol evaluando concretamente el efecto de la administración concomitante de ambas drogas sobre la actividad de las metaloproteinasas e integridad de la BHE.

Nuestra intención al proponer este trabajo sigue siendo la de dotar a las autoridades sanitarias competentes de evidencia científica, objetiva y contrastable, del grave daño que puede conllevar, para la población afectada, el consumo de 'drogas de diseño' y alcohol. Así mismo, consideramos se contribuirá a establecer y reforzar las bases para el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento y prevención de los problemas clínicos y sociológicos asociados al consumo recreativo de estas drogas de abuso.

Nuestra hipótesis está soportada por los siguientes resultados previos de nuestro grupo y de otros grupos:

1. La hipertermia y el daño neuronal inducidos por MDMA en roedores ha sido repetidamente demostrada por nuestro grupo y otros laboratorios (Scanzello et al., 1993; Lew et al., 1996; Sabor et al., 1996; Colado et al., 1993, 1995, 1997, 1998, 1999). Se ha observado la existencia de un proceso de estrés oxidativo que se refleja por un incremento en la producción de radicales libres y en el grado de peroxidación lipídica (Colado et al., 1997; O'Shea et al., 2001; Sanchez et al., 2001; Colado et al., 2001; Camarero et al., 2002; Sanchez et al., 2003; O'Shea & Colado, 2003; Green et al., 2003). Datos recientes procedentes de nuestro laboratorio indican que MDMA causa una respuesta inflamatoria que consiste en una intensa activación microglial, la liberación de citocinas pro-inflamatorias y la translocación al núcleo de factores de transcripción tales como NFκB (Orío et al., 2004; O'Shea et al., 2005; Orío et al., 2009). Minociclina, una tetraciclina semisintética, inhibe la activación microglial, la



liberación de IL-1 β , la translocación de NF κ B al núcleo y proporciona protección parcial frente a la neurotoxicidad inducida por MDMA (Orio et al., 2009). MDMA también produce un incremento en la expresión de receptores CB2 inmediatamente después de su administración y JWH-015, agonista CB2, regula la producción de factores neurotóxicos tales como IL-1 β (Torres et al., 2010).

2. Se ha observado un incremento en la permeabilidad de la BHE en diferentes condiciones experimentales que se acompañan de hipertermia y la temperatura cerebral *per se* parece ser un importante factor que interviene en la regulación de la permeabilidad de la BHE, en las alteraciones de la homeostasis del contenido de agua cerebral y en las anomalías estructurales subsiguientes de las células cerebrales (Kiyatkin y Sharma 2009). MDMA induce un incremento en la temperatura cerebral y rectal que correlaciona positivamente con el grado de neurotoxicidad serotoninérgica que induce la droga a largo plazo (Escobedo et al., 2007). El efecto de MDMA sobre la integridad de la BHE no ha sido estudiado en detalle. Tras revisar la literatura solamente hemos encontrado un trabajo en el que se examinan los efectos producidos por la administración aguda de MDMA sobre la permeabilidad de la BHE en rata y ratón (Sharma y Ali, 2008). Este estudio demuestra la extravasación de azul Evans inmediatamente después de la administración de la droga, un marcado incremento en el contenido de agua y alteraciones en el balance iónico de Na⁽⁺⁾, K⁽⁺⁾, y Cl⁽⁻⁾.

3. Miembros de la familia de enzimas conocidas como metaloproteinasas (MMPs) se activan y degradan componentes de la matriz extracelular en una variedad de patologías y lesiones cerebrales. Las MMPs se han relacionado con la propagación y regulación de procesos neuroinflamatorios que acompañan a la mayoría de las enfermedades del SNC (Rosenberg, 2002; Cunningham et al., 2005) y contribuyen al procesamiento biológico de IL-1 β . Resultados preliminares de nuestro laboratorio indican que MDMA aumenta significativamente el mRNA of TIMP-1 en la corteza frontal 4 h después de la administración de MDMA y la expresión de MMP-9 en el hipocampo 24h tras la inyección de la droga (datos no publicados).

4. Datos relativamente recientes, algunos procedentes de estudios *in vitro* (Haorah et al., 2007; Haorah et al., 2008), indican que el alcohol altera la integridad de la BHE pero el mecanismo subyacente no es del todo conocido. En otros estudios se hace referencia a que el etanol únicamente altera la permeabilidad de la BHE tras su administración crónica pero no a dosis que producirían intoxicación (Pan et al., 2008). A diferencia de la MDMA, el etanol no produce una respuesta hipertérmica sino todo lo contrario, a determinadas dosis produce una franca hipotermia. Por tanto, en este caso, un aumento de la temperatura corporal no sería el factor desencadenante del posible aumento de la permeabilidad capilar que pudiera producir la administración mantenida de etanol a dosis moderadas y altas (Elmas et al., 2001).

5. En nuestro laboratorio hemos estudiado algunas interacciones neuroquímicas y conductuales entre etanol y MDMA (proyectos previos financiados por PNSD). Los resultados demuestran que la exposición intermitente a concentraciones elevadas de etanol en plasma potencia la neurotoxicidad serotoninérgica inducida por la MDMA siendo la magnitud de este efecto más pronunciada al aumentar los niveles plasmáticos de acetaldehído cuando se inhibe la actividad de la aldehído deshidrogenasa. El efecto del etanol sobre la toxicidad de la MDMA no se relaciona con cambios en la hipertermia aguda puesto que en ratas pre-expuestas a altas concentraciones de etanol en plasma, la MDMA produjo una respuesta hipertérmica similar a la observada en ratas control. Aunque el etanol aumenta la formación de radicales libres que induce la MDMA, este proceso de estrés oxidativo no sería suficiente para explicar el efecto del etanol sobre la neurotoxicidad de la MDMA (Izco et al., 2007; O'Shea y Colado



2007). Parece por tanto razonable evaluar el efecto producido sobre la integridad de la BHE por la administración concomitante de MDMA y etanol.

ARTÍCULOS PUBLICADOS COMO CONSECUENCIA DE LA ACCIÓN: (Se adjuntarán tres separatas de cada uno de ellos)

Artículos publicados

Mayado A., Torres E., Gutierrez-Lopez MD., Colado MI., O'Shea E. Interleukin-1 β release following low dose MDMA induces tolerance against the 5-HT neurotoxicity produced by challenge MDMA. *J. Neuroinflammation* 2011 Nov 24;8(1):165. [Epub ahead of print].

EIAlí A., Urrutia A., Rubio A., Colado MI, Hermann, DM. Apolipoprotein-E controls ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on cerebral microvessels after methamphetamine intoxication. *Stroke* 2012 Jun;43(6):1647-53. Epub 2012 Mar 15.

Urrutia A., Rubio-Araiz A, Gutierrez-Lopez MD., EIAlí A., Hermann D., O'Shea E., Colado MI. A study on the effect of JNK inhibitor, SP600125, on the disruption of blood-brain barrier induced by METH. *Neurobiol Dis.* 2013 Feb;50:49-58. doi: 10.1016/j.nbd.2012.10.006. Epub 2012 Oct 12.

Peraile I, Granado N, Torres E, Gutiérrez-López MD, Moratalla R, Colado MI, O'Shea E. Cocaine potentiates MDMA-induced oxidative stress but not dopaminergic neurotoxicity in mice: implications for the pathogenesis of free radical-induced neurodegenerative disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013 Nov;230(1):125-35. doi: 10.1007/s00213-013-3142-5. Epub 2013 May 17.

Urrutia A, Granado N, Gutierrez-Lopez MD, Moratalla R, O'Shea E, Colado MI. The JNK inhibitor, SP600125, potentiates the glial response and cell death induced by methamphetamine in the mouse striatum. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014 Feb;17(2):235-46. doi: 10.1017/S1461145713000850. Epub 2013 Oct 8.

O'Shea E, Urrutia A, Green AR, Colado MI. Current preclinical studies on neuroinflammation and changes in blood-brain barrier integrity by MDMA and methamphetamine. *Neuropharmacology*. 2014 Mar 2. pii: S0028-3908(14)00079-3. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.02.015. [Epub ahead of print].

Rubio-Araiz A*, Perez-Hernandez M*, Urrutia A, Porcu F, Borcel E, Gutierrez-Lopez MD, O'Shea E, Colado MI. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) disrupts blood-brain barrier integrity through a mechanism involving P2X7 receptors. *Int J Neuropsychopharmacol* (2014), 0, 1-13. doi:10.1017/S1461145714000145

Ponencias en congresos y reuniones científicas

Autores: Colado MI.

Título: Mecanismos de estrés implicados en la dependencia del alcohol

Tipo de participación: Ponencia

Congreso: Claves Neurocientíficas en Adicciones

Publicación:

Lugar celebración: Hospital Doce de Octubre, Madrid

Fecha: 15 Noviembre 2013

Autores: Colado MI.

Título: Neuroinflamación e integridad de la BHE tras administración de MDMA (éxtasis)



Tipo de participación: Ponencia
Congreso: Seminario de Investigación del IDISSC
Publicación:
Lugar celebración: Hospital Clínico San Carlos, Madrid
Fecha: 5 Noviembre 2013

Autores: Colado MI.
Título: Respuesta neuroinflamatoria inducida por MDMA (éxtasis)
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: XL Jornadas Nacionales de Socidrogalcohol
Publicación:
Lugar celebración: Murcia
Fecha: 18-20 Abril 2013

Autores: Colado MI.
Título: Neurobiología del éxtasis (MDMA)
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: 1ª Reunión de los grupos del Área de Neurociencia. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San carlos (IdISSC)
Publicación:
Lugar de celebración: Madrid
Fecha: 14 Diciembre 2012

Autores: Colado MI.
Título: Efecto de metanfetamina sobre la integridad de la barrera hematoencefálica
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: 1ª Jornada de Neurociencia de la UCM en el Instituto Cajal.
Publicación:
Lugar de celebración: Instituto Cajal, Madrid
Fecha: 27 Enero 2012

Autores: Colado MI.
Título: Bases farmacológicas de la eficacia de los tratamientos en toxicomanías
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Toxicomanías
Publicación:
Lugar celebración: Bilbao.
Fecha: 1-3 Junio 2011

Autores: Colado MI.
Título: Esquizofrenia dual. ¿Los mismos antipsicóticos?
Tipo de participación: Ponencia
Congreso: Mesa Redonda sobre Patologías Duales en la Real Academia Nacional de Farmacia
Publicación:
Lugar celebración: Madrid.
Fecha: 24 Marzo 2011

Contribuciones a Congresos Internacionales

Autores: ElAli A, Urrutia A, Rubio-Araiz A, Hernandez-Jimenez M, Colado MI, Doepner TR, Hermann DM.
Título: Apolipoprotein-E controls ATP-binding cassette transporters ABCB1 and ABCC1 on cerebral microvessels after methamphetamine intoxication.



Tipo de presentación: Poster.

Congreso: 16th Congress of the European-Federation-of-Neurological-Societies (EFNS).

Publicación: European Journal of Neurology 19, Supplement: 1, 489-489, 2012.

Lugar de celebración: Stockholm, Sweden.

Fecha: 8-11 Septiembre 2012.

Autores: Granado, N.; Ares-Santos, S.; Ruiz, I.; Espadas, I.; O'Shea, E.; Naranjo, J. R.; Colado, M. I.; Moratalla, R.

Título: D2 dopamine receptors are involved in neurotoxicity induced by mdma and methamphetamine in mice.

Tipo de presentación: Poster.

Congreso: 40th Annual Meeting of the Society-for-Neuroscience.

Publicación: Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary Planner.

Lugar de celebración: San Diego, CA, USA.

Fecha: 13-17 Noviembre 2010.

Autores: Moratalla R, Granado N, Ares-Santos S, Ruiz I, Espadas I, O'Shea E, Colado MI.

Título: D2 Dopamine receptors are involved in neurotoxicity induced by MDMA and Methamphetamine in mice

Tipo de presentación: Poster

Congreso: 7th Federation of European Neuroscience Societies Congress

Publicación: Amsterdam (Holanda)

Lugar de celebración:

Fecha: 3-7 Julio 2010

Contribuciones a Congresos Nacionales

Autores: Porcu F, Rubio-Araiz A, Pérez-Hernández M, Gutiérrez-López MD, O'Shea E, Colado MI

Título: El consumo intensivo de etanol ('binge drinking') produce alteraciones en la barrera hematoencefálica y en la respuesta glial en el hipocampo del ratón.

Tipo de presentación: Oral

Congreso:

Publicación:

Lugar de celebración: Oviedo

Fecha: 24-25 Septiembre 2013

Autores: Urrutia A, Rubio-Araiz A, Guitierrez-Lopez MD, El Ali A, Hermann DM, O'Shea E, Colado MI

Título: Efecto de la metanfetamina en la activación de las metaloproteinasas: Implicación en la neurotoxicidad.

Tipo de presentación: Oral.

Congreso: Reunión de la Red de Trastornos Adictivos-Sociedad Española de Neurociencia-CIBERSAM.

Publicación:

Lugar de celebración: Salamanca

Fecha: 27-28 Septiembre 2011

Autores: Rubio-Araiz A, Torres E, Urrutia A, Guitierrez-Lopez MD, O'Shea E, Colado MI

Título: Cambios inducidos por metanfetamina en la integridad de la barrera hematoencefálica

Tipo de presentación: Poster

Congreso: Reunión de la Red de Trastornos Adictivos-Sociedad Española de Neurociencia

Publicación:

Lugar de celebración: Salamanca

Fecha: 27-28 Septiembre 2011

Autores: Rubio-Araiz A, Torres E, Urrutia A, Guitierrez-Lopez MD, O'Shea E, Colado MI

Título: Cambios inducidos por metanfetamina en la integridad de la barrera hematoencefálica



Tipo de presentación: Poster

Congreso: Farmadrid XX (Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid)

Publicación:

Lugar de celebración: UNED Madrid, Facultad de Psicología

Fecha: 4 Julio 2011

Autores: Urrutia A, Rubio-Araiz A, Guterrez-Lopez MD, ElAli E, Hermann DM, O'Shea E, Colado MI

Título: Efecto de la metanfetamina en la activación de las metaloproteinasas: Implicación en la neurotoxicidad.

Tipo de presentación: Oral

Congreso: Farmadrid XX (Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid)

Publicación:

Lugar de celebración: UNED Madrid, Facultad de Psicología

Fecha: 4 Julio 2011

Autores: Ares-Santos S., Granado N., Oliva I., O'Shea E., Martin ED., Colado MI., Moratalla R.

Título: Inactivation of dopamine D1 receptors protects against neurotoxicity induced by MDMA and methamphetamine.

Tipo de presentación: Oral

Congreso: Red de Trastornos Adictivos-Sociedad Española de Neurociencia- CIBERSAM. Lugar de celebración: Salamanca

Fecha: 27-28 Septiembre 2011.

Autores: Granado N., Ares-Santos S., Oliva I., O'Shea E., Martin ED., Colado MI, Moratalla R.

Título: Dopamine D2-receptor Knockout mice are protected against dopaminergic neurotoxicity induced by methamphetamine or MDMA.

Tipo de presentación: Poster.

Congreso: Red de Trastornos Adictivos-Sociedad Española de Neurociencia- CIBERSAM. Lugar de celebración: Salamanca

Fecha: 27-28 Septiembre 2011.

Autores: Torres E, Gutierrez-López MD, Mayado A, O'Shea E, Colado MI

Título: Implicación de los receptores CB2 en la regulación de los cambios inducidos por MDMA sobre el receptor IL-1RI y sus ligandos endógenos

Tipo de presentación: Oral

Congreso: Farmadrid XIX (Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid)

Publicación:

Lugar de celebración: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia

Fecha: 5 Julio 2010

Autores: Mayado A, Torres E, Gutierrez-López MD, Colado MI, O'Shea E

Título: Papel de la IL-1 β en el desarrollo de precondicionamiento por exposición a MDMA frente a la neurotoxicidad producida por la droga.

Tipo de presentación: Poster

Congreso: Farmadrid XIX (Reunión de Farmacólogos de la Comunidad de Madrid)

Publicación:

Lugar de celebración: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia

Fecha: 5 Julio 2010

Tesis Doctorales

Doctorando: Andrés Urrutia Elorduy

Directores: M^a Isabel Colado y M^a Dolores Gutiérrez López



Título: Efecto de metanfetamina sobre la actividad de metaloproteinasas y sobre la integridad de la barrera hematoencefalica en ratón. Estudios de neurotoxicidad.

Calificación: Sobresaliente cum laude, defendida el 01/02/2013.

Organismo: Universidad Complutense

Doctorando: Francesca Porcu

Directores: M^a Isabel Colado y Esther O'Shea Gaya

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

Calificación: Sobresaliente cum laude, en tramitación, defensa en Julio 2014.

Organismo: Universidad Complutense

Doctorando: Mercedes Pérez Hernández

Directores: M^a Isabel Colado, M^a Dolores Gutiérrez López, Esther O'Shea

Título: Efecto de MDMA sobre la actividad de metaloproteinasas y sobre la integridad de la barrera hematoencefalica en ratón. Regulación por receptores P2X7.

Calificación: En ejecución

Organismo: Universidad Complutense

MODIFICACIONES DE LA METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO SOBRE LOS PROYECTADOS Y SU JUSTIFICACIÓN:

Debido a la falta de disponibilidad de MDMA, comenzamos a desarrollar los mismos objetivos del proyecto con metanfetamina. Los estudios con MDMA se llevaron a cabo posteriormente y son los que se han incluido en esta memoria final.

OBJETIVOS PLANTEADOS: (Transcribir los del proyecto original)

El objetivo de este proyecto es doble: 1) Evaluar los cambios inducidos por 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA, éxtasis) sobre la actividad de metaloproteasas y sobre la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) en diversas áreas cerebrales y su regulación por la pre-exposición mantenida a dosis moderadas y altas de etanol, y 2) Establecer una relación entre dichos cambios y la respuesta inflamatoria y neurotóxica que induce la droga en la rata a corto y largo plazo, respectivamente. Estos objetivos se desglosan en los siguientes sub-objetivos:

1. Estudiar el curso temporal de los cambios inducidos por MDMA sobre la expresión y actividad de gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) en cerebro de rata y determinar la localización celular de las MMPs en células neuronales y microglia. La expresión de TIMP-2 y TIMP-1 será también evaluada simultáneamente.
2. Estudiar el curso temporal de los cambios inducidos por MDMA sobre la permeabilidad de la BHE y sobre las proteínas de unión estrecha de las células endoteliales y de la lámina basal que podrían conducir a un incremento en la permeabilidad.
3. Evaluar si los cambios inducidos por MDMA sobre la actividad de MMP-2/-9, expresión de TIMP-2/-1 e integridad de la BHE son dependientes de la respuesta hipertérmica inducida por la droga y por tanto, podrían ser reducidos inhibiendo la hipertermia que produce MDMA (administrando la droga a una temperatura ambiente de 4°C) o aumentados cuando la respuesta hipertérmica de MDMA es más pronunciada (administrando la droga a una temperatura ambiente de 30°C).



4. Examinar el efecto de inhibidores de MMPs sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad de las MMPs y en la integridad de la BHE. Se evaluará también la implicación de MMP-2/-9 en la neurotoxicidad a largo plazo sobre los terminales serotoninérgicos que induce la MDMA. Para ello se evaluará la capacidad de inhibidores de MMPs para prevenir la disminución en la densidad del transportador de 5-HT que produce la droga.
5. Examinar el efecto de la pre-exposición mantenida a etanol sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad de MMP-2/-9, expresión de TIMP-2/-1.
6. Examinar el efecto de la pre-exposición mantenida a etanol sobre los cambios inducidos por MDMA en la integridad de la BHE.
7. Examinar el efecto de la pre-exposición mantenida a etanol sobre la liberación de citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β), activación microglial y sobre la actividad transcripcional de NF κ B inducida por MDMA.
8. Examinar el efecto de la pre-exposición mantenida a etanol sobre la hipertermia y neurotoxicidad inducidas por MDMA.

OBJETIVOS CONCRETOS ALCANZADOS: (Ordenar de igual forma que los planteados. En el caso de proyectos coordinados, el coordinador deberá describir además el desarrollo de la coordinación entre subproyectos en este año, y los resultados de dicha coordinación con relación a los objetivos globales del proyecto)

1. Estudiar el curso temporal de los cambios inducidos por MDMA y metanfetamina sobre la expresión y actividad de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, MMP-3) en cerebro de roedores.

Efecto de MDMA sobre la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-3.

Un ensayo de zimografía en gel revela una banda de aproximadamente 82 kDa que corresponde a la forma activa de MMP-9. El análisis cuantitativo de la imagen mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo de MDMA (10mg/kg, i.p.) sobre la actividad de MMP-9 ($F_{4,28}=8.87$, $p<0.0001$). Post-hoc análisis indicaron que MDMA produjo un incremento sustancial en la actividad de MMP-9 1h (75%) tras su administración. Este efecto no fue evidente a 6 o 24 h aunque la actividad de MMP-9 permanecía ligeramente elevada a las 3 h.

Para estudiar la posibilidad de que el aumento en la actividad de MMP-9 fuera debido a un incremento en la expresión enzimática, se realizó un ensayo de Western blot. Las bandas de MMP-9 pro-activa y activa se detectaron a 92 and 82 kDa, respectivamente. El análisis cuantitativo de las imágenes reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la expresión de MMP-9 pro-activa ($F_{4,28}=3.09$, $p=0.033$) y activa ($F_{4,27}=4.68$, $p=0.005$). Análisis post-hoc indicaron que MDMA aumentó significativamente la expresión de MMP-9 pro-activa (36%) y activa (35%) 1 h tras su administración. Este efecto no fue evidente 3, 6 or 24 h más tarde.

El zimograma de caseína mostró una banda de aproximadamente 45 kDa correspondiente a la forma activa de MMP-3. El análisis cuantitativo de la imagen mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo de MDMA (10mg/kg, i.p.) sobre la actividad de MMP-3 ($F_{4,25}=4.24$, $p=0.009$). Análisis post-hoc indicaron que MDMA produjo un incremento sustancial en la actividad de MMP-3 3 h después de su administración (55%). Un ensayo de Western blot detectó las bandas de MMP-3 pro-activa y activa a 53 y 45 kDa, respectivamente. El análisis cuantitativo de cada una de las bandas mediante ANOVA de una vía reveló que la MDMA no produjo ningún efecto sobre la expresión de la forma pro-activa de MMP-3 ($F_{4,23}=2.31$, $p=0.089$) pero modificó la expresión de la forma activa de MMP-3 ($F_{4,23}=3.39$, $p=0.026$). Análisis post-hoc indicaron que la expresión de la forma activa de MMP-3 6 h después de la administración de MDMA fue diferente de la observada a las 3 h de la inyección de la droga.

Efecto de metanfetamina (METH) sobre la expresión y actividad de MMP-9 y MMP-2.



METH (4 mg/kg, i.p., 3 veces cada 3 h) produjo cambios en la actividad estriatal de MMP-9 pero no en MMP-2. El análisis cuantitativo de los zimogramas mediante ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento sobre la actividad de MMP-9 ($F_{3,25}=18.79$, $p<0.0001$) pero no sobre la actividad de MMP-2 ($F_{3,22}=0.46$, $p=0.71$). Análisis post-hoc indican que METH produjo un incremento sustancial en la actividad de MMP-9 (207%) 1h después de su administración. Este efecto no fue evidente 3h o 24h más tarde.

Para estudiar la posibilidad de que un aumento en la actividad de MMP-9 fuera debido a un incremento en la expresión de la enzima, se realizaron estudios de western blot de MMP-9 y MMP-2. De manera similar a los resultados mostrados en el zimograma, la forma activa de MMP-9 se detectó como una banda a 97 kDa. Respecto a MMP-2 se detectaron 2 bandas, pro-activa y activa a 72 y 64 kDa, respectivamente. El análisis cuantitativo de la banda activa mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la expresión de MMP-9 ($F_{3,20}=11.52$, $p<0.0001$) pero no de MMP-2 ($F_{3,19}=0.23$, $p=0.88$). Análisis post-hoc indican que METH aumenta significativamente la expresión de MMP-9 (23%) 1h tras su administración. Este efecto no fue evidente 3h después, aunque hubo una reducción (22%) 24h después del tratamiento.

2. Evaluar el curso temporal de los cambios inducidos por MDMA y metanfetamina sobre la permeabilidad de la BHE y sobre la expresión de las proteínas de la lámina basal que podrían conducir a un incremento en la permeabilidad.

Efecto de MDMA sobre la expresión de laminina y colágeno-IV y sobre la extravasación de IgG

Un incremento en la actividad de MMP-9 y MMP-3 se asocia con la degradación de laminina y colágeno-IV. Por tanto, mediante inmunohistoquímica y Western blot estudiamos el efecto de MDMA sobre la inmunoreactividad de laminina y colágeno-IV.

El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado a diferentes tiempos de la administración de la MDMA mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de laminina ($F_{4,22}=7.54$, $p=0.0006$). Análisis post-hoc indicaron que MDMA redujo significativamente la inmunoreactividad de laminina a 1 h (37%), 3 h (35%) y 6 h (31%). Para confirmar estos datos, se realizó un ensayo de Western blot. Se detectó una banda de laminina a 220 kDa. El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{4,24}=10.05$; $p<0.0001$). Análisis post-hoc indicaron que disminuyó sustancialmente la expresión de laminina 1 h (48%), 3 h (47%) y 6 h (27%) tras su administración.

Respecto a colágeno-IV, el análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado a diferentes tiempos de la administración de la MDMA mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de colágeno-IV ($F_{4,21}=6.28$, $p=0.0017$). Análisis post-hoc indicaron que MDMA redujo significativamente la inmunoreactividad de colágeno-IV a 1 h (60%), 3 h (54%), 6 h (60%) y 24 h (29%).

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) se visualizó y cuantificó mediante el análisis de la inmunoreactividad de IgG. La expresión de IgG en el parénquima cerebral es indicativa de la disrupción de la BHE. El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado a diferentes tiempos de la administración de la MDMA mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de IgG ($F_{4,22}=2.96$, $p=0.043$). El análisis post-hoc indicó que MDMA incrementó sustancialmente la extravasación de IgG 3 h pos-inyección (38%).

Efecto de METH sobre la expresión de laminina y sobre la extravasación de IgG

Para comprobar la especificidad de los cambios inducidos por METH sobre la actividad y expresión de MMP-9, examinamos la expresión de laminina como una proteína representativa de la matriz extracelular que se expresa ampliamente en el cerebro y que media las interacciones célula-matriz necesarias para la supervivencia neuronal (Indyk et al., 2003). Mediante western blot se detectó una banda principal para laminina a 220 kDa. ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,17}=4.12$; $p=0.0228$). Análisis post-hoc indicaron que METH produjo una disminución sustancial en la expresión de laminina 1h (44%) después del tratamiento.

La permeabilidad de la barrera hematoencefálica fue visualizada y cuantificada mediante inmunotinción de IgG. ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,13}=5.71$, $p=0.0102$). Análisis post-hoc



indicaron que METH aumentó sustancialmente la extravasación estriatal de IgG 1h (87%), 3h (148%) y 24h (116%) post-inyección.

Zimografía *in situ* mostró abundante actividad gelatinasa en el estriado de los ratones tratados con METH 1h después del tratamiento. Estudios de co-localization revelaron una tinción mayor de IgG alrededor de los vasos coincidiendo con una mayor actividad gelatinasa. Estos resultados indican que la extravasación de IgG y, por tanto, la disrupción de la barrera hematoencefálica, ocurre en áreas en las cuales la actividad de MMP-9 está aumentada.

METH produce un aumento en la expresión de fibronectina y vitronectina en el estriado del ratón 1h después de su administración. Este efecto no se observa a las 24h de suspender el tratamiento.

3. Evaluar si los cambios inducidos por MDMA y metanfetamina sobre la integridad de la BHE son dependientes de la respuesta hipertérmica inducida por la droga y por tanto, podrían ser reducidos inhibiendo la hipertermia que produce MDMA (administrando la droga a una temperatura ambiente de 4°C) o aumentados cuando la respuesta hipertérmica de MDMA es más pronunciada (administrando la droga a una temperatura ambiente de 30°C).

Los cambios inducidos por METH y MDMA sobre la integridad de la BHE no parecen estar directamente relacionados con la hipertermia que producen ambas drogas. Esta afirmación se basa en que ninguno de los compuestos que se mencionan a continuación y que son capaces de prevenir el efecto de MDMA y METH sobre la permeabilidad de la BHE, reduce la hipertermia que producen estos derivados anfetamínicos (ver resultados más adelante).

4a. Examinar el efecto de inhibidores de la actividad de JNK1/2 y de la actividad de MMPs sobre los cambios inducidos por metanfetamina en la actividad de las MMPs y en la integridad de la BHE. Se evaluará también la implicación de MMP-2/-9 en la neurotoxicidad a largo plazo sobre los terminales dopaminérgicos que induce metanfetamina. Para ello se evaluará la capacidad de inhibidores de MMPs para prevenir la disminución en la densidad del transportador de dopamina que produce la droga.

Efecto de inhibidores de la actividad de JNK1/2 sobre los cambios inducidos por METH en la integridad de la BHE

Hemos estudiado el efecto de SP600125 sobre los cambios inducidos por METH sobre la actividad de MMP-9, degradación de laminina e inmunoreactividad de IgG. SP600125 (30 mg/kg, i.p.) se administró 30 min antes de la última inyección de METH. En un estudio previo demostramos un incremento en la fosforilación de JNK1/2 tras la administración de METH. Considerando la importancia de JNK en las vías inducidas por estrés, estudiamos la implicación de JNK 1/2 en los cambios inducidos por METH sobre la actividad de MMP-9 y la integridad de la barrera hematoencefálica.

Con respecto a la actividad de MMP-9, el ANOVA de una vía revela un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,18}=4.19$, $p=0.0205$). El análisis post-hoc indicó que SP600125 previno el incremento inducido por METH sobre la actividad de MMP-9.

Puesto que un aumento en la actividad de MMP-9 se relaciona con la degradación de laminina, examinamos el efecto de la inhibición de JNK sobre la expresión de laminina. El ANOVA de una vía y análisis post-hoc indican que SP600125 previno la reducción inducida por METH en la expresión de laminina ($F_{3,18}=3.66$, $p=0.0322$).

En relación con la inmunoreactividad de IgG, el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,17}=49.88$, $p<0.0001$). Análisis post-hoc indican que SP600125 previene el incremento inducido por METH sobre la inmunoreactividad de IgG.

Hemos estudiado el efecto de SP600125 sobre la expresión de pJNK 1/2 y sobre la hipertermia inducida por METH. Recientemente hemos demostrado un incremento en las formas fosforiladas de JNK1/2 en el estriado 3h después de la administración de METH. Este efecto desapareció a las 24h (EIAli et al., 2012). Con el estudio actual hemos ampliado esta información demostrando un incremento en la activación 1h después de METH



coincidiendo con los cambios inducidos por la droga sobre la actividad de MMP-9 y degradación de laminina. Este incremento en la fosforilación de JNK1/2 fue prevenido por SP600125.

Considerando la importancia de la hipertermia en la integridad de la barrera hematoencefálica, examinamos el efecto de SP600125 sobre la hipertermia de METH. El ANOVA de 2 vías indicó un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,47}=17,88$, $p<0.001$). Análisis post-hoc revelaron que METH aumentó la temperatura rectal alcanzando un pico 30-60 min después de cada inyección ($F_{1,24}=14,08$, $p<0.001$). SP600125 no modificó esta respuesta hipertérmica ($F_{1,27}=0.007$, $p=0.98$) aunque redujo ligeramente la temperatura de animales inyectados con salino ($F_{1,20}=10.17$, $p<0.001$).

Efecto de inhibidores de MMPs sobre los cambios inducidos por METH en la integridad de la BHE

Hemos estudiado el efecto de BB-94 (Batimastat, 50mg/kg, i.p. 30 min antes de la primera y última inyección de METH), un inhibidor de la actividad de las metaloproteinasas, sobre los cambios inducidos por METH en la expresión de laminina y permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la expresión de laminina ($F_{3,16}=5.16$, $p=0.0144$). Análisis post-hoc indicaron que BB-94 previno la reducción inducida por METH sobre la expresión de laminina.

En relación con la inmunoreactividad de IgG, el ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,13}=4.77$, $p=0.018$). Análisis post-hoc indicaron que BB-94 previno el incremento en la inmunoreactividad de IgG inducido por METH.

ANOVA de 2 vías indicó que hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la temperatura rectal ($F_{3,83}=37.07$, $p<0.0001$). Análisis post-hoc revelaron que METH aumentó la temperatura rectal ($F_{1,55}=83.32$, $p<0.0001$). BB-94 atenuó este efecto hipertérmico ($F_{1,50}=13.26$, $p<0.001$) pero no afectó a la temperatura corporal de los animales inyectados con salino ($F_{1,33}=0.14$, $p=0.69$).

Hemos estudiado el efecto de METH sobre la actividad estriatal de MMP-9 y sobre la expresión de laminina en ratones mantenidos a 4°C. El objetivo de este estudio era determinar si un efecto sobre la temperatura corporal estaba implicado en la protección ejercida por BB94 frente a los cambios inducidos por METH sobre la actividad de MMP-9 y la expresión de laminina.

En estas condiciones experimentales, METH también produjo un incremento en la actividad estriatal de MMP-9 (102%) 1h después del tratamiento, pero este efecto fue menor que el observado en ratones inyectados con METH a una temperatura ambiente estándar (207%). A baja temperatura ambiente METH también redujo la expresión de laminina, siendo este efecto similar al observado en el estriado de ratones mantenidos a temperatura ambiente estándar. METH, administrada a una temperatura ambiente de 4°C, produjo una disminución de corta duración sobre la temperatura rectal que revirtió completamente a los 180 min. Aunque la temperatura rectal fue superior a la observada en animales inyectados con salino ($F_{1,35}=4.78$, $p=0.035$), no se observó la marcada hipertermia que produce METH a temperatura ambiente estándar.

Efecto de SP600125 y BB94 sobre la neurotoxicidad dopaminérgica de METH

Hemos estudiado la capacidad de SP600125 y BB94 para prevenir o atenuar la neurotoxicidad inducida por METH. Para ello se cuantificó la concentración de dopamina (HPLC) y la densidad de su transportador (DAT) ([3H]-WIN 35,428) en estriado de animales que habían recibido METH únicamente o METH en combinación con uno de los dos compuestos. Una semana después de la administración de METH se observó una reducción en la concentración estriatal de dopamina y en la densidad de DAT, efectos que no fueron modificados por la administración de BB94 ni por la administración de SP600125.

4b. Examinar el efecto de antagonistas de receptores P2X7 sobre los cambios inducidos por MDMA en la actividad de las MMPs y en la integridad de la BHE.

Efecto de un antagonista de receptores P2X7 sobre los cambios inducidos por MDMA en la integridad de la BHE

Para investigar el papel de los receptores P2X7 sobre los cambios inducidos por MDMA en las actividades de las MMPs, se evaluó la capacidad de Brilliant Blue G (BBG) para prevenir estos cambios.



El análisis cuantitativo de las imágenes de los zimogramas de MMP-9 y MMP-3 mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo sobre las actividades de MMP-9 ($F_{3,16}=10.35$, $p=0.0005$) y MMP-3 ($F_{3,30}=7.25$, $p=0.0008$). El análisis post-hoc indicó que BBG previno el incremento inducido por MDMA sobre la actividad de MMP-9 and MMP-3.

BBG previno la degradación de las proteínas de la lamina basal y la extravasación de IgG. El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de laminina ($F_{3,14}=17.83$, $p<0.0001$). Análisis post-hoc indicaron que BBG previno completamente la reducción inducida por MDMA sobre la inmunoreactividad de laminina. Estos resultados fueron confirmados mediante Western blot. El ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento ($F_{3,15}=6.03$, $p=0.0066$). Análisis post-hoc indicaron que BBG previno completamente la reducción inducida por MDMA sobre la expresión de laminina.

El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de colágeno-IV ($F_{3,13}=4.92$, $p=0.017$). Análisis post-hoc indicaron que BBG atenuó la reducción inducida por MDMA sobre la inmunoreactividad de colágeno-IV.

El análisis cuantitativo de las imágenes de fluorescencia en el giro dentado mediante ANOVA de una vía reveló un efecto significativo del tratamiento sobre la inmunoreactividad de IgG ($F_{3,16}=5.61$, $p=0.008$). Análisis post-hoc indicaron que BBG atenuó el incremento inducido por MDMA sobre la extravasación de IgG.

Considerando la importancia de la hipertermia en la integridad de la BHE, se estudió el efecto de BBG y A-438079 sobre la hipertermia inducida por MDMA. El ANOVA de dos vías indicó que hubo un efecto significativo del tratamiento sobre la temperatura rectal de los animales ($F_{3,14}=70.78$, $p<0.0001$ para BBG; $F_{3,16}=35.59$, $p<0.0001$ para A-438079). Análisis post-hoc revelaron que MDMA incrementó la temperatura rectal alcanzando un pico entre 30–60 min tras la inyección ($F_{1,7}=68.18$, $p<0.0001$; $F_{1,8}=60.74$, $p=0.0001$). BBG o A-438079 no modificaron esta respuesta hipertérmica ($F_{1,8}=0.62$, $p=0.45$; $F_{1,8}=0.25$, $p=0.63$, respectivamente) ni alteraron la temperatura de los animales inyectados con salino ($F_{1,6}=0.74$, $p=0.42$; $F_{1,8}=4.17$, $p=0.08$, respectivamente).

5. Examinar el efecto de la exposición mantenida a etanol sobre la expresión de MMPs.

Las determinaciones se realizaron tanto en animales sometidos a un ciclo de exposición de alcohol, como en animales sometidos a 4 ciclos. 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%).

6. Examinar el efecto de la exposición mantenida a etanol sobre la integridad de la BHE.

Se ha utilizado el modelo de consumo de etanol en la oscuridad conocido en la literatura internacional como *Drinking in the Dark*. 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. Los animales tuvieron acceso al etanol durante 4 días consecutivos: los primeros 3 días durante 2h y el cuarto día durante 4h. 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. Se sacrificaron inmediatamente después de finalizar la exposición a etanol o a las 24h.

En este estudio, se procedió a analizar la expresión de IgG, laminina y colágeno 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).

Respecto a 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%).

Respecto a colágeno, 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%). 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).

7. Examinar el efecto de la exposición mantenida a etanol sobre la activación astrogliar y microgliar, muerte neuronal, señalización TLR4 y expresión de MAPKs.

Utilizando el marcador astrogliar GFAP se ha estudiado la respuesta astrogliar 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).

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.

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).



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 ($F_{2,15} = 2.19$, $p = 0.14$).

Se ha demostrado que el etanol induce neuroinflamación y que este efecto está mediado entre otros mecanismos por la activación del receptor toll-like 4 (TLR4) en astrocitos. 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%).

La proteína del grupo de alta movilidad box1 (HMGB1) se une a TLR4 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. 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%).

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 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%).

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.

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%).

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%).



APLICABILIDAD Y UTILIDAD PRÁCTICA DE LOS RESULTADOS EN EL ÁREA DE LAS DROGODEPENDENCIAS. (En caso de memoria final)

La principal función de la barrera hematoencefálica consiste en mantener la homeostasis del cerebro y proteger al sistema nervioso central de toxinas exógenas y endógenas procedentes de la circulación. Las drogas que modifican la integridad de la barrera hematoencefálica aumentando la permeabilidad pueden aumentar la concentración de cualquier sustancia activa en el cerebro y pueden favorecer la infiltración de mediadores patológicos de la periferia haciendo que el sistema nervioso central sea más vulnerable al daño. De hecho varios estudios en consumidores indican que la administración de metanfetamina incrementa la permeabilidad de la barrera dando lugar a la entrada en el parénquima del sistema nervioso central de varios pequeños virus y de moléculas neurotóxicas procedentes del metabolismo viral que quedarían retenidas en la periferia en condiciones fisiológicas normales. La metanfetamina es capaz de potenciar la infección por HIV de macrófagos derivados de monocitos, la principal diana del virus y podría facilitar el transporte de leucocitos infectados al cerebro. Este efecto podría explicar la elevada incidencia de trastornos neurológicos relacionados con SIDA que se observan en los consumidores de metanfetamina. La interacción entre MDMA y HIV aún no se ha caracterizado pero hay evidencias que indican que los consumidores de éxtasis pueden estar en riesgo de contraer infección por HIV y otras infecciones virales transmitidas por la sangre.

PATENTES U OTROS RESULTADOS EXPLOTABLES COMERCIALMENTE QUE SEAN CONSECUENCIA DEL PROYECTO. (En caso de memoria final)

OTRAS SUBVENCIONES O RECURSOS (INCLUIDOS FONDOS PROPIOS) QUE FINANCIAN ESTE PROYECTO O PENDIENTES DE RESOLUCIÓN:

SUBVENCIONES O AYUDAS SOLICITADAS PARA ESTE PROYECTO Y NO CONCEDIDAS: organismo, convocatoria y cantidad.

OTRAS CONSIDERACIONES QUE SE DESEE HACER CONSTAR

Colaboraciones con otros grupos de investigación directamente relacionadas con el proyecto

Colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Dirk Hermann, Department of Neurology, University Hospital Essen, Essen, Germany.

En esta fecha se remite también por correo electrónico, a la dirección pndinvestigacion@msps.es la presente memoria.

En Madrid a 6 de Junio de 2014

FIRMA

M^a Isabel Colado Megía