

AYUDAS ECONÓMICAS PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2014

Investigadora principal: COLADO MEGIA, Maria Isabel

Nº de expediente: 2014I015

Entidad: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina

Tipo de investigación: BÁSICA

Nombre del proyecto: *Implicación de la vía kinurenina en la disrupción de la barrera hematoencefálica y su relevancia en el consumo y efectos reforzantes del etanol*

Número de anualidades: 3

1ª anualidad: 51868

2ª anualidad: 16330

3ª anualidad: 24495

Total concedido: 92693

OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es doble: 1) Evaluar los cambios inducidos por el consumo intensivo y repetido de etanol sobre los catabolitos del triptófano (TRYCATs) en el hipocampo de ratón y su papel en la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE) producida por el modelo de *binge drinking, drinking in the dark* (DID) y, 2) Evaluar el efecto producido por la modulación farmacológica de los niveles cerebrales de KYNA sobre el consumo y los efectos reforzantes del etanol.

Objetivos específicos del proyecto:

1. Estudiar el curso temporal de los cambios inducidos por el consumo intensivo y repetido de etanol (DID, 4 ciclos consecutivos) sobre la expresión y actividad de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1), kinurenina-3-monooxigenasa (KMO) y kinurenina aminotransferasa (KAT-II) en hipocampo de ratón y determinar la localización celular de estas enzimas en microglia, astrogliá y neuronas. También se determinará la actividad de IDO1 en plasma así como los efectos del etanol sobre los niveles plasmáticos y cerebrales de triptófano, serotonina y TRYCATs.

2. Examinar si la inhibición de la actividad de IDO1 influye sobre los cambios inducidos por el consumo intensivo y repetido de etanol (DID, 4 ciclos consecutivos) en las proteínas de unión estrecha, sobre la lámina basal y sobre la extravasación de IgG en hipocampo. Para ello, se expondrán a etanol ratones IDO1 *knockout* o ratones pre-tratados con un inhibidor IDO1. Se analizará el efecto del inhibidor de IDO1 sobre la actividad de IDO así como los niveles de TRYCATs en plasma y cerebro de animales expuestos a etanol.

3. Examinar las consecuencias de una reducción en los niveles de KYNA cerebral sobre los cambios inducidos por el consumo intensivo y repetido de etanol (DID, 4 ciclos consecutivos) en las proteínas de unión estrecha, sobre la lámina basal y sobre la extravasación de IgG en hipocampo. Para ello, se expondrán a etanol ratones KAT II *knockout* o ratones pre-tratados con un inhibidor de KAT II. Se analizará el efecto del inhibidor de KAT II sobre la actividad de KAT II así como los niveles de KYNA en cerebro de animales expuestos a etanol.

4. Examinar las consecuencias de una reducción periférica en los niveles de ácido quinolinico sobre los cambios inducidos por el consumo intensivo y repetido de etanol (DID, 4 ciclos consecutivos) en las

proteínas de unión estrecha, sobre la lámina basal y sobre la extravasación de IgG en hipocampo. Para ello, se expondrán a etanol ratones pre-tratados con un inhibidor de KMO. Se analizará el efecto del inhibidor de KMO sobre la actividad de KMO así como los niveles de KYNA y QUIN en cerebro de animales expuestos a etanol.

5. Examinar el efecto de los inhibidores de IDO1, KAT II y KMO sobre el consumo de etanol en los animales expuestos a 4 ciclos de etanol (DID).

6. Evaluar el efecto de los inhibidores de IDO1, KAT II y KMO sobre el consumo y preferencia por etanol, en un modelo de acceso intermitente y preferencial que genera un consumo voluntario y excesivo de etanol.

7. Se estudiará el efecto del inhibidor de KAT II y KMO sobre la liberación de dopamina en núcleo accumbens y en el área tegmental ventral inducida por el consumo intensivo y repetido de etanol (DID, 4 ciclos consecutivos) y se determinará la implicación de receptores colinérgicos nicotínicos $\alpha 7$ y NMDA.

8. Determinar la actividad de IDO1 en plasma así como los niveles plasmáticos de triptófano, serotonina y TRYCATs en muestras de sangre periférica (plasma) obtenidas de pacientes con intoxicación aguda alcohólica, así como de sujetos controles.

HIPÓTESIS

1) El consumo intensivo y repetido de etanol utilizando el modelo de *binge drinking*, *Drinking in the Dark* (DID), produce cambios tempranos en los niveles de los catabolitos del triptófano (TRYCATs), incluyendo kinurenina, ácido kinurénico (KYNA) y ácido quinolínico (QUIN) que comprometen la integridad de la BHE. Estos cambios pueden ser debidos a modificaciones en la actividad de varios enzimas, tales como indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), kinurenina aminotransferasa (KAT) y kinurenina-3-monooxigenasa (KMO) en microglia, astrocitos, células endoteliales e incluso en neuronas que podrían alterar el balance entre KYNA (neuroprotector) y QUIN (neurotóxico). Puesto que los niveles de kinureninas cerebrales están influenciados por la vía kinurenina periférica, parece razonable proponer que fluctuaciones en los niveles plasmáticos de estos metabolitos puedan afectar directamente el metabolismo de la vía kinurenina a nivel central.

2) Un aumento de los niveles cerebrales de KYNA, mediante herramientas farmacológicas, podría contrarrestar selectivamente determinados efectos conductuales y neuroquímicos inducidos por etanol y que serían los responsables del abuso y la dependencia a etanol, específicamente sería esperable observar una reducción en el consumo y en la activación de la vía dopaminérgica mesolímbica responsable de los efectos reforzantes.

Estas hipótesis están avaladas por los siguientes resultados previos de nuestro grupo y de otros laboratorios:

1. El efecto del etanol sobre la integridad de la BHE ha sido estudiada en el proyecto previo financiado por PNSD en la convocatoria del 2010. Los datos muestran que el consumo intensivo y repetido de etanol, utilizando el paradigma *drinking in the dark*, altera la estructura y permeabilidad de la BHE, lo cual se refleja en un incremento en la extravasación de IgG y una mayor degradación de laminina y colágeno, proteínas constituyentes de la matriz extracelular. Se observa también un aumento en la actividad de MMP3 y del factor tisular del plasminógeno que pueden contribuir a la degradación de la lámina basal, puesto que tanto laminina como colágeno-IV son sustratos de estas enzimas (Ichinose et al., 1986, Chen

y Strickland, 1997, Chen et al., 2003). Estos efectos podrían estar mediados por un incremento en la liberación de citocinas pro-inflamatorias que a su vez activarían protein-quinasas activadas por mitógeno (MAPKs). De hecho, el consumo intensivo y repetido de etanol origina un incremento en la expresión de TLR4 y de la fosforilación de ERK1/2 y p38. Además, induce una modesta activación astrogliar reflejada por un incremento en la inmunoreactividad de GFAP y S100B. Los cambios inducidos por etanol sobre la permeabilidad de la BHE y la respuesta glial implican la señalización de TLR4 ya que no se observan en ratones TLR4 *knockout*.

2. La vía kinurenina está estrechamente controlada por el sistema inmune periférico y central y, una disregulación de la vía, causando hiper- o hipofunción de metabolitos activos, se asocia con trastornos neurodegenerativos y neurológicos (O'Connor et al 2009; Kim et al., 2012; Zunszain et al., 2012). La vía kinurenina se expresa en su totalidad en células del linaje de los monocitos, tales como macrófagos y microglia (Heyes et al., 1992). Los astrocitos carecen de kinurenina monooxigenasa (KMO), por tanto, pueden producir KYNA y kinurenina pero no QUIN (Guillemin et al., 2001). Las células endoteliales sintetizan constitutivamente KYNA y en presencia de IFN γ sintetizan adicionalmente kinurenina (Owe-Young et al., 2008). No hay expresión deIDO y KMO en células endoteliales no estimuladas o pericitos pero la expresión deIDO es inducida tras estimulación con IFN γ y TNF α (Owe-Young et al., 2008).

3. Hay evidencias implicando la vía kinurenina y el ácido quinolínico en el daño de la BHE. IDO-1 se expresa en células endoteliales cerebrales murinas procedentes de tejido cerebral infectado con malaria y se asocia con la ruptura de la BHE (Hansen et al., 2004). La actividad de IDO-1 en el cerebro aumenta en modelos de malaria cerebral experimental (Sanni et al., 1998). La actividad de la enzima γ -glutamyl-transpeptidasa unida a membrana, utilizada como marcador de daño capilar, disminuye tras la administración i.c.v. de QUIN en ratas, lo cual sugiere una disfunción de la BHE (St'astny et al., 1997). El QUIN (i.c.v.) potencia el daño en los capilares cerebrales e incrementa la permeabilidad de la BHE a la albumina plasmática en cerebro de rata (St'astny et al., 2000).

4. El KYNA es un mediador de los efectos agudos sobre la neurotransmisión dopaminérgica inducidos por d-anfetamina (Olsson et al., 2009, 2012) y delta-9-tetrahydrocannabinol (Justinova et al., 2013). En particular reduce el efecto de refuerzo de delta-9-tetrahydrocannabinol y agonistas cannabinoides sintéticos y la conducta de búsqueda de la droga inducida por re-exposición a cannabinoides (Justinova et al., 2013).