

**Universidad CEU Cardenal Herrera**

Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología



**“Efecto del consumo crónico de  
etanol sobre el cerebro de rata.  
Tratamiento con naltrexona.”**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por: Dña. M<sup>a</sup> Inmaculada Almansa Frías

Dirigida por: Dr. D. Francisco Javier Romero Gómez

Dr. D. Jorge Miguel Barcia González

**VALENCIA**

**2011**



Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

Ministerio de Ciencia e Innovación: Proyectos SAF2007/66801,  
SAF2010/21317.

Ministerio de Sanidad y Consumo, Plan Nacional sobre Drogas. (2010/059).

Universidad Cardenal Herrera-CEU (PRUCH08, PRUCH09 y COPERNICUS  
CEU-UCH / SANTANDER).

Red de Trastornos Adictivos (RTA), Instituto Ciencias de la Salud Carlos III.



## AGRADECIMIENTOS

Después de tantos años llega por fin el momento de presentar este trabajo, y como no, debo agradecer a todas las personas gracias a las cuales he conseguido llegar a este punto, y que sin ellas nada de esto hubiera tenido lugar. Pido disculpas de antemano por si me dejo alguien en el tintero, pero es lo que tiene escribir los agradecimientos a ciertas horas de la noche el día antes de imprimir...

Primero de todo agradecer a mis directores de tesis, a Javier Romero y Jorge Barcia. Gracias Javier por guiarme por el camino de la ciencia, por hacerme pensar más allá de un simple resultado. En muchas ocasiones hemos “robado” tiempo a tu familia, y eso no tiene precio. Y por supuesto nunca olvidar la “congruencia y estilo”, que es ahora cuando me doy cuenta de lo importante que es.

Jorge, tu has estado conmigo a pie de bancada, gracias por contagiarme tu entusiasmo. Aunque muchas veces los resultados “no te acababan de gustar”, pero siempre ves la parte positiva.

A María Miranda, gracias a ti he llegado hasta aquí, sobre todo en mi última etapa has estado conmigo siempre. Te considero mi hermana mayor del laboratorio y eres un ejemplo para todos, tanto a nivel personal como profesional. Junto a María Muriach estuvisteis conmigo en mis principios, me enseñasteis las técnicas del laboratorio. Gracias por la paciencia que tuvisteis, y por ser un ejemplo de trabajo y empeño.

Gracias también a Paco, me acuerdo un día cuando aún no había acabado la carrera, me dijiste “Inma, en una tesis se trabaja y se llora mucho”... no sabes que razón tenias!!! pero he descubierto que si estás rodeada de buena gente, al final se llega a buen puerto.

A Emma, las dos empezamos juntas, no puedo enumerar todos los momentos que hemos pasado, los congresos, nuestros inicios con los pequeños roedores, hacíamos un buen equipo, eh?. Y aunque ahora mismo no estemos codo con codo, se que estarás conmigo siempre, ya que además de una compañera de laboratorio eres una buena amiga!!!

Gracias a Samuel, sobre todo en el último tramo, has sido mi espejo, gracias por el ánimo. A mis compañeros del laboratorio, a Raquel, M<sup>a</sup>Vi, Violeta, Brenda, y las nuevas incorporaciones Miguel, Teresa, Sara y Miriam. Gracias por “aguantarme” todas mis manías, ya se que soy un poco “huelepedetes”, y que mis notitas pueden ser interminables. Muchas gracias a Rosa, ella me ha ayudado siempre, gracias a ella he llevado mejor eso de quedarnos hasta las mil por poner un primario y me ha ensañado que si se trabaja con empeño se puede alcanzar todo lo que nos proponemos.

Al grupo de Tecno. Cristina y Andrés, también desde el principio habeis estado ahí, compartiendo penas y alegrías. A tus compis Araceli, Sergio y Cesar.

A los vecinos de laboratorio, al grupo BQ. Gracias a Nacho y Enric. Nacho, eres un ejemplo de que si algo te apasiona vives por y para ello, ya desde las clases de Bioquímica de la carrera se notaba que te apasionaba la investigación y eso se transmite. Gracias a Enric por ayudarme siempre, por ser un “Maniatic” andante, por solucionarme todas las dudas, y tener siempre palabras de ánimo.

A Pilar, sin ti estoy segura que no hubiera llegado donde estoy ahora. Desde la carrera me has ayudado en todo, y siempre me has escuchado y apoyado cuando las cosas no iban bien. Gracias por aguantar todas mis “boladas” de cabeza y ser mi confidente.

A Mocholí, tu me has demostrado que si realmente quieres una cosa debes luchar por ella con uñas y dientes. Me has enseñado a tener una visión crítica de la ciencia. Contigo he compartido muy buenos momentos en Barcelona, descubriendo garitos nuevos cada día. Y ahora con tu aventura en los EEUU, eres la prueba viviente de que “si quieres, puedes”.

A Olga y Bego (primero como compis de labo, y después como vecinas), Juana, Marta H siempre me habéis ayudado, y animado en estos años.

A Marta L. eras una de las pocas personas que conozco que tiene una convicción y entereza capaz de mover montañas, gracias por darnos ese ejemplo de superación y arrojo, me enorgullece ser tu amiga.

Muchas gracias a las “secres”, Ana, Pepa, Sara y Victoria, sin lugar a duda sin vuestra ayuda, no hubiera salido sana y salva del agujero negro de la burocracia y papeleos que suponen una tesis.

Durante mi etapa predoctoral he estado en diferentes laboratorios haciendo estancias, que me han enriquecido muchísimo tanto científicamente como a nivel personal.

La primera fue en Barcelona, en el laboratorio de Carmen García y José Carlos Fernandez-Checa, muchas gracias a los dos por enseñarme a descubrir el apasionante mundo de la mitocondria, aprendí muchísimo de vosotros. Gracias a Ana Colell, Anna Moles, Laura, Joan, Fran, y especialmente a Anna Fernández, me hicisteis sentir una más del grupo y eso hace mucho más fácil el trabajo. Anna gracies per ajudarme amb tot, per tindre tanta paciència amb mi, per deixar que fora la vostra “mini yo”, tinc molts bons records de la meua estancia a Barcelona, i en part són gracies a tu.

La segunda estancia fue en Torino, gracias Giorgio por ayudarme en todo lo que necesité y por tener paciencia con mi inglés, gracias a los miembros del grupo Sara, Giulia y Marco. Y especialmente a Ornella, Sergio y Franca, han sido mi familia italiana. Grazie mille a tutti.

A David, el es una de las cosas buenas que ha tenido este doctorado. Gracias por apoyarme y soportarme siempre. Me has dado fuerza y ánimo, y sin duda alguna sin ti mi vida no hubiera sido la misma.

Y por último pero no por ello menos importante, a mi familia. Gracias a mis padres, no voy a tener años en esta vida para agradecerlos todo el esfuerzo que habéis hecho para que llegara hasta aquí, me habéis ayudado en la carrera y animado durante la investigación, es por eso que a vosotros os dedico mi tesis.

**GRACIAS**

I. Introducción.....	1
1. Alcoholismo.....	1
2. Neuropatología del alcohol.....	1
2.1. Alteraciones inducidas por el alcohol sobre el hipocampo.....	3
3. Sistema opioide.....	4
3.1. Alcohol y receptores opioides.....	5
3.2. La Naltrexona.....	7
3.2.1. Mecanismo de acción de la Naltrexona.....	9
4. Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB).....	10
4.1. Modulación de la expresión de CREB por el alcohol.....	12
5. Factor Neurotrófico derivado de Cerebro.....	14
6. Neurogénesis en el hipocampo adulto.....	15
6.1. Marcadores de supervivencia y proliferación.....	18
6.1.1. Bromodeoxiuridina (BrdU).....	18
6.1.2. Doblecortina.....	18
6.2. Neurogénesis y etanol.....	20
7. Estrés oxidativo. Radicales libres.....	21
7.1. Papel fisiológico de los radicales libres.....	23
7.2. Papel patogénico de los radicales libres.....	23
7.3. Peroxidación lipídica.....	24
7.3.1. Productos de la peroxidación de lípidos.....	25
7.4. Defensas antioxidantes.....	26
7.4.1. El sistema glutatión.....	27
7.5. Alcoholismo y estrés oxidativo.....	29
8. Mitocondria.....	30
8.1. Estructura y composición.....	31
8.2. Transporte y permeabilidad mitocondrial.....	32
II. Objetivos.....	35
III. Material y métodos.....	37
1. Tratamiento de los animales.....	37
1.1. Condiciones de estabulación.....	37
2. Diseño experimental.....	38



---

2.1. Administración de la dieta líquida.....	38
2.2. Administración de la naltrexona.....	38
2.3. Administración de bromodeoxiuridina (BrdU).....	39
3. Obtención de las muestras.....	40
3.1. Suero.....	40
3.2. Hipocampo.....	40
3.3. Extracción mitocondrial.....	41
4. Procedimiento analíticos.....	42
4.1. Determinación de la alcoholemia.....	42
4.2. Determinación de proteínas.....	42
4.3. Determinación de malondialdehído.....	43
4.4. Determinación de glutatión.....	45
4.5. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa.....	46
4.6. Determinación de colesterol libre.....	48
4.7. Determinación de la capacidad antioxidante.....	49
4.8. Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-Blot.....	50
5. Estudios inmunohistoquímicos.....	52
5.1. Inmunohistoquímica de BrdU.....	52
5.2. Inmunohistoquímica de doblecortina.....	53
6. Estudio estadístico.....	54
6.1. Estadística descriptiva.....	54
6.2. Pruebas estadísticas.....	54
IV. Resultados.....	57
1. Evolución del consumo de dieta y del peso de los animales de experimentación .....	57
2. Niveles de alcoholemia .....	58
3. Capacidad antioxidante de la naltrexona.....	58
4. Estudio del suero.....	59
4.1. Parámetros bioquímicos.....	59
4.1.1. Concentración de MDA en suero.....	59
4.1.2. Actividad GPx en suero.....	60
5. Estudio del hipocampo.....	61

5.1. Parámetros bioquímicos.....	61
5.1.1. Concentración de MDA en hipocampo.....	61
5.1.2. Actividad GPx en hipocampo.....	62
5.1.3. Ratio GSH/GSSG.....	63
5.2. Estudio de las proteínas pCREB/CREB y BDNF en hipocampo.....	64
5.3. Estudio inmunohistoquímico.....	65
5.3.1. BrdU.....	65
5.3.2. Doblecortina.....	66
6. Estudio de los efectos del etanol sobre la mitocondria de cerebro.....	68
6.1. Concentración de colesterol libre.....	68
6.2. Concentración de glutatión.....	69
6.3. Liberación de proteínas proapoptóticas.....	70
V. Discusión.....	73
1. Efecto de la administración crónica de etanol sobre el estrés oxidativo en el cerebro de rata.....	73
1.1. Efecto del consumo de alcohol sobre la mitocondria de cerebro.....	74
1.2. Naltrexona en el tratamiento del alcoholismo. ¿propiedades antioxidantes?.....	77
2. El etanol modula la expresión de pCREB y BDNF.....	80
3. Efecto del consumo de alcohol sobre la neurogénesis.....	84
VI. Conclusiones.....	89
VII. Extended summary in English.....	91
VIII. Bibliografía.....	155
IX. Anexo I.....	166

**INDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Acción del alcohol sobre el cerebro.....	3
<b>Figura 2:</b> Estructura molecular de la naltrexona.....	8
<b>Figura 3:</b> Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB.....	11
<b>Figura 4:</b> Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo adulto.....	17
<b>Figura 5:</b> Esquema de la cascada de diferenciación neuronal.....	20
<b>Figura 6:</b> Esquema de mecanismos implicados en la lipoperoxidación.....	25
<b>Figura 7:</b> Estructura química del MDA.....	26
<b>Figura 8:</b> Esquema de la estructura mitocondrial.....	32
<b>Figura 9:</b> Esquema de los transportadores de las membranas de la mitocondria.....	33
<b>Figura 10:</b> Esquema del modelo experimental.....	39
<b>Figura 11:</b> Esquema de la administración de BrdU.....	40
<b>Figura 12:</b> Evolución del peso medio de las ratas.....	57
<b>Figura 13:</b> Capacidad antioxidante total.....	59
<b>Figura 14:</b> Concentración de MDA en suero.....	60
<b>Figura 15:</b> Actividad GPx en suero.....	61
<b>Figura 16:</b> Concentración de MDA en hipocampo.....	62
<b>Figura 17:</b> Actividad de GPx en hipocampo.....	62
<b>Figura 18:</b> Ratio GSH/GSSG en hipocampo.....	63
<b>Figura 19:</b> Western blot de pCREB, CREB y BDNF.....	64
<b>Figura 20:</b> Gráfica de la expresión BrdU.....	65
<b>Figura 21:</b> Inmunohistoquímica de BrdU.....	66
<b>Figura 22:</b> Gráfica de la expresión de DCX.....	67
<b>Figura 23:</b> Inmunohistoquímica de DCX.....	67
<b>Figura 24:</b> Concentración de colesterol en homogenizado de cerebro.....	68
<b>Figura 25:</b> Concentración de colesterol en mitocondria de cerebro.....	68
<b>Figura 26:</b> Concentración de GSH en homogenizado de cerebro.....	69
<b>Figura 27:</b> Concentración de GSSH en homogenizado de cerebro.....	69
<b>Figura 28:</b> Concentración de GSH en mitocondria de cerebro.....	70
<b>Figura 29:</b> Concentración de GSSG en mitocondria de cerebro.....	70
<b>Figura 30:</b> Liberación de proteínas proapoptóticas.....	71



**Abreviaturas empleadas**

AC	Adenilato Ciclasa
ADH	Enzima Aldehido deshidrogenasa
ANT	Adenine nucleotid transporter
ATR	Atractilosido
ATV	Área Tegmental Ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridina
CREB	Elemento de unión en respuesta al cAMP (cAMP response element binding)
DA	Dopamina
DCX	Doblecortina
DGPNSD	Dirección General del Plan Nacional sobre Drogas
GABA	Ácido Gammaaminobutírico
GD	Giro dentado de hipocampo
GPx	Glutación Peroxidas
GSH	Glutación
GSHm	Glutación mitocondrial
GSSH	Glutación oxidado
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión (High pressure liquid cromathography)
IRM	Imagen de Resonancia Magnética

## Abreviaturas

---

LPT	Potenciación a largo plazo (Long term potentiation)
MDA	Malondialdehído
MPT	Permeabilidad mitocondrial transitoria
NAc	Núcleo <i>accumbens</i>
NGF	Factor de crecimiento neural (Neural grow factor)
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Oxido nítrico sintasa neuronal
NPY	Neuropéptido Y
PKA	Protein kinasa A
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCN	Sistema nervioso central
VDAC	Canal iónico dependiente de voltaje

## **I.- INTRODUCCIÓN**





## **1. Alcoholismo.**

El consumo de bebidas alcohólicas es un hábito ampliamente extendido y culturalmente aceptado en la mayoría de las sociedades occidentales. En nuestro país, el consumo de bebidas como el vino o la cerveza es un acto social, cultural y gastronómico consolidado dentro de las costumbres sociales. Sin embargo, el consumo de bebidas alcohólicas en España y los problemas relacionados con las mismas tienen gran importancia. Somos uno de los primeros países productores y también uno de los primeros consumidores (DGPNSD, 2010).

El alcohol es la droga de consumo más extendida en España según los últimos datos recogidos por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas (DGPNSD). Si bien el consumo de la población general está disminuyendo, la proporción de borracheras entre los jóvenes no va en la misma dirección. En 2009/10 el 78.7 % de la población española entre 15 y 64 años consumió alcohol «*en el último año*», el 63.3 % lo hizo “*en el último mes*” y el 11% lo consumió “*a diario*” (DGPNSD, 2010).

La dependencia y el abuso del alcohol son las enfermedades mentales más abundantes en Norteamérica, donde aproximadamente el 14% de la población es diagnosticado como alcohólico crónico durante algún período de su vida (Lejoyeux et al., 2000). Además, el alcohol está implicado en prácticamente la mitad de los accidentes de tráfico y en la mayoría de los homicidios, suicidios y casos de violencia doméstica, siendo la ingesta crónica una importante causa de muerte.

Por su parte, durante los últimos 30 años los científicos han puesto su atención en el problema del alcohol para descubrir sus bases, claves para el tratamiento y la prevención (Room et al., 2005).

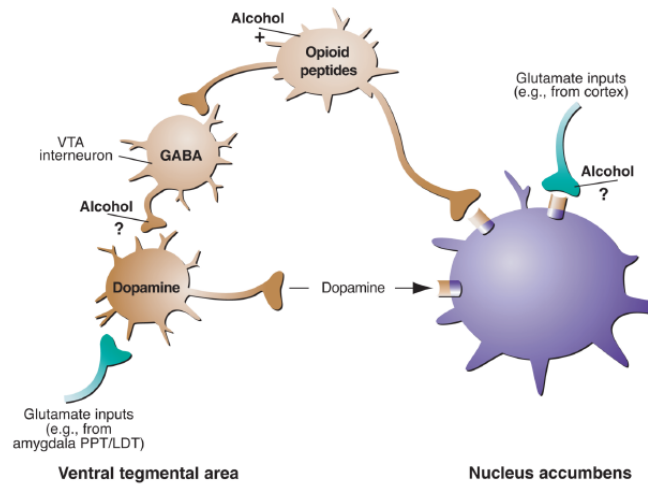
## **2. Neuropatología del alcohol.**

Aunque la neurobiología de las drogas psicoactivas se ha descrito con gran detalle, no ocurre lo mismo en el caso del alcohol. Los efectos reforzantes del consumo de alcohol parece que se deben a una interacción con varios neurotransmisores entre los que se incluyen el ácido gammaaminobutírico (GABA)

y el sistema opioide principalmente, aunque también afecta a la dopamina (DA), el glutamato y la serotonina (Koob & Nestler, 1997).

La escasa información en el caso del alcohol se debe a que su mecanismo de acción es inespecífico, ya que puede tener efectos en una amplia variedad de sistemas de neurotransmisión. Parece que el alcohol actúa no sólo potenciando la actividad inhibitoria en los receptores GABA A, sino también reduciendo la actividad excitadora en el subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) de los receptores glutamatérgicos. Es decir, el alcohol potencia la inhibición y reduce la excitación y esto puede explicar su caracterización como “depresor” del funcionamiento neuronal del sistema nervioso central (SNC). Estos efectos del alcohol pueden explicar algunos de sus efectos tóxicos, amnésicos y atáxicos. Sin embargo, teóricamente las propiedades reforzantes del alcohol están mediadas por los efectos que sobre el GABA y sobre el glutamato produce en la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico (Figura 1). Por otra parte, también parece liberar tanto opiáceos como cannabinoides en el sistema de recompensa. El bloqueo de receptores cannabinoides en animales reduce el *craving* por el alcohol en animales dependientes. El bloqueo de receptores opiáceos con naltrexona en humanos alcohólicos disminuye el *craving* y, en consecuencia, aumenta las tasas de abstinencia. Si uno bebe mientras está tomando naltrexona, los opiáceos liberados no producen placer.

Se han propuesto varios mecanismos moleculares involucrando a los receptores NMDA los cuales se regulan al alza por la administración de etanol confiriendo a las neuronas una mayor sensibilidad a la respuesta citotóxica inducida por el glutamato. En virtud de esta alteración de los receptores NMDA, el alcohol también puede dañar a las neuronas por la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, generando además estrés oxidativo. Otros mecanismos implican al glutamato, a la toxicidad del aminoácido homocisteína con su grupo sulfhidrilo, aunque esta acción se puede deber a deficiencias en folato, por la anemia nutricional presente en muchos pacientes alcohólicos (Harper & Matsumoto, 2005).



**Figura 1.** Acción del alcohol sobre el cerebro.

La toxicidad neurológica relacionada con el etanol comprende varias entidades clínicas y patológicas, a saber: encefalopatía de Wernicke, síndrome amnésico de Korsakoff, demencia alcohólica, atrofia cerebral, neuropatía alcohólica, miopatía alcohólica, degeneración cerebelosa, ambliopía nutricional alcohólica, mielínolisis central pontina, enfermedad de Marchiafava-Bignami y el síndrome alcohólico fetal. Todas estas enfermedades afectan de forma predominante, cuando no exclusiva, a sujetos dependientes del etanol, es decir, a alcohólicos crónicos (Diamond, 1992).

### 2.1 Alteraciones inducidas por el alcohol sobre el hipocampo.

Está documentado que el consumo crónico de alcohol provoca daños cognitivos en los pacientes alcohólicos (Harper & Matsumoto, 2005). Algunos estudios han sugerido que los daños cognitivos pueden afectar al proceso de recuperación del paciente y a la implantación de estrategias de tratamiento (Bates et al., 2002).

Se ha identificado al hipocampo como una de las regiones más sensibles a los efectos del alcohol. Las funciones cognitivas en las que interviene esta región como son la memoria a corto plazo y la memoria espacial, son particularmente vulnerables a los efectos del alcohol (Ryabinin, 1998). Estudios de neuroimagen han

mostrado una reducción significativa del volumen hipocampal en pacientes alcohólicos (De Bellis et al., 2000; Geuze et al., 2005). En modelos animales de alcoholismo se observa una disminución en el grosor de la capa granular del giro dentado (GD) del hipocampo que se debe a una pérdida de neuronas (Walker et al., 1980). Estudios de neuroimagen han documentado una pérdida tanto de sustancia blanca como gris en la zona cortical y un aumento del tamaño de los ventrículos en individuos consumidores de alcohol (Pfefferbaum et al., 1992; Sullivan et al., 1995; Agartz et al., 1999).

La mayoría de los estudios post-mortem en humanos consideraban el periodo del abuso del alcohol, pero no el periodo de abstinencia previo a la muerte. Este punto debería ser revisado ya que, estudios de IRM (Imagen por resonancia magnética) han demostrado un grado notable de reversibilidad en el incremento del tamaño del ventrículo observado en alcohólicos dentro de periodos cortos de abstinencia (White et al., 2000). Concretamente, observaron que la disminución de los volúmenes hipocampales es reversible con la abstinencia. La reversibilidad en la pérdida de volúmenes hipocampales ha sido atribuida a cambios en la sustancia blanca del cerebro (Harding et al., 1997), pero la incorporación de nuevas neuronas al giro dentado podría estar también afectada por el alcohol. Es importante señalar, que se ha demostrado una cierta reversibilidad en la pérdida de funciones cognitivas dependientes del hipocampo, en los periodos de abstinencia.

### **3. Sistema opioide.**

El sistema opioide endógeno tiene diversas funciones fisiológicas, incluyendo la regulación del dolor (inhibiendo la respuesta al estímulo doloroso), la modulación de la función gastrointestinal, endocrina, sistema autónomo, el aprendizaje y la memoria.

Los receptores opioides tienen un papel muy relevante en el circuito cerebral de recompensa y la adicción, representan el sustrato neurobiológico común que media la propiedad reforzadora de la mayoría de las drogas de abuso, así como la dependencia física. Los opioides liberan dopamina en el núcleo *accumbens* (NAc),

un fenómeno común de todas las drogas de abuso, principalmente mediante la inhibición de las interneuronas GABA del área tegmental ventral (ATV) (Gutstein & Akil, 2001; Flórez, 2003).

Los receptores opioides están acoplados a proteínas G ( $G_{ai}/\alpha$ ). Tras la estimulación de un receptor opioide se produce una inhibición de la actividad de la adenilciclase, con reducción de la concentración del AMPc y de la actividad de la proteinquinasa dependiente de AMPc o PKA, lo que resulta en una disminución de la fosforilación de proteínas. Se produce además una facilitación del cierre de los canales de calcio en las neuronas presinápticas, por lo que se reduce la liberación de neurotransmisor, así como, la apertura de canales de potasio (GIRK) de las neuronas postsinápticas, lo que provoca una hiperpolarización de la membrana y como consecuencia una reducción de su activación. Por tanto, son receptores que median acciones inhibitorias (Flórez, 2003) (Gutstein & Akil, 2001).

### **3.1. Alcohol y receptores opioides.**

Como se ha indicado anteriormente el alcohol tiene efectos sobre diversos sistemas de neurotransmisión, como el del ácido GABA, la dopamina, los opioides y la serotonina, y en años recientes se han incorporado datos de su interacción con el glutamato. En el cerebro, el alcohol actúa sobre estructuras y sistemas relacionados con sensaciones placenteras (sistema dopaminérgico mesolímbicocortical), lo cual le confiere propiedades con potencial adictivo.

El sistema opioide es uno de los sistemas más importantes en el control del consumo de alcohol (O'Malley, 1996; Herz, 1997). Se ha propuesto que el alcohol podría provocar la liberación de ciertos péptidos opioides (Jamensky & Gianoulakis, 1997; Koob et al., 1998). Se ha sugerido que el incremento de actividad en el cerebro de encefalinas o de  $\beta$ -endorfinas tanto en condiciones basales como en respuesta al consumo de alcohol, puede ser importante para la iniciación y mantenimiento del alto consumo de la droga (Gianoulakis et al., 1997; Froehlich et al., 2000). Así mismo, se ha descrito que el incremento de la densidad de receptores

opioides tanto  $\mu$  como  $\delta$  en áreas del cerebro media en el reforzamiento positivo de los efectos de las drogas de abuso (Marinelli et al., 2000).

Las  $\beta$ -endorfinas en el (ATV) actúan inhibiendo la actividad de las neuronas GABAérgicas, lo cual, a su vez, reduce la acción inhibitoria que en estado normal produce GABA sobre las neuronas dopaminérgicas de este área, incrementando así la liberación de dopamina en las terminales que proyectan tanto a la corteza prefrontal como al NAc (vía mesolímbico-cortical) (Di Chiara & Imperato, 1988). Se sabe que una gran variedad de drogas de abuso con mecanismos celulares diferentes actúan sobre esta vía mesolímbico-cortical (Juárez, 2004).

Si consideramos que el alcohol provoca la liberación de opioides endógenos como las  $\beta$ -endorfinas (Gianoulakis, 1990; Gianoulakis et al., 1996), y que varias estructuras relacionadas con mecanismos de reforzamiento, como el NAc, tienen receptores opioides, parte del efecto gratificante del alcohol puede ser mediado por una acción directa de las  $\beta$ -endorfinas sobre estas estructuras, además de su acción facilitadora en la liberación de dopamina desde el TVA. Por otra parte, se ha postulado que los niveles bajos de  $\beta$ -endorfinas pueden ser el resultado directo de un consumo crónico de alcohol (Gianoulakis et al., 1996) y que esta deficiencia de  $\beta$ -endorfinas durante el período de abstinencia puede contribuir a la generación de ansiedad y a la búsqueda del consumo de alcohol, ya que se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles de  $\beta$ -endorfinas y la ansiedad durante este período (Kiefer et al., 2002).

El contenido de opioides, su biosíntesis y liberación están alterados por el consumo crónico de alcohol, aunque en la literatura existen discrepancias en cuanto a la dirección de los cambios producidos. Se ha descrito que el etanol produce tanto un aumento, una disminución o incluso una ausencia de cambios en la actividad del sistema opioide. Estas discrepancias en la literatura pueden ser debidas a las diferencias metodológicas de los estudios como por ejemplo la administración de etanol (ingerido en la bebida, por la dieta, inhalado, etc.), la cantidad y la duración del consumo, al igual que las diferentes especies utilizadas (Kalant, 1985; Gianoulakis, 1993; Tabakoff & Hoffman, 1996).

Cuando se deja de administrar el alcohol, se produce un aumento rebote del AMPc. Este gran incremento del AMPc aumenta la excitabilidad de las neuronas y

es la base molecular de los signos y síntomas de la abstinencia. Este fenómeno se ha demostrado en el *locus coeruleus*, el NAc, el ATV y la sustancia gris periacueductal. Parece ser que, el causante de la regulación por incremento del sistema del AMPc es el aumento de la producción de un factor de transcripción llamado CREB (proteína que se une a elementos de respuesta a AMPc). Además, el CREB aumenta la síntesis de dinorfina, sustancia que activa los receptores kappa en las neuronas del (ATV), que produce una disminución de la liberación de dopamina en el NAc. Esta reducción contribuye al estado emocional negativo (disforia y anhedonia) característico de la abstinencia (Bailey & Connor, 2005).

### **3.2 La Naltrexona.**

La utilización de fármacos ha incrementado de forma significativa los éxitos terapéuticos del tratamiento de la dependencia alcohólica, proporcionando un profundo conocimiento de los procesos adictivos y un enfoque terapéutico más causal (Swift, 1999; Johnson, 2000).

Las principales acciones terapéuticas están dirigidas a:

1. Provocar aversión al consumo de alcohol, utilizando fármacos antidipsotrópicos o interdictores, que actúan inhibiendo la metabolización del acetaldehído (disulfiram, cianamida cálcica).
2. Disminuir el refuerzo asociado al consumo alcohólico, bloqueando las acciones opioidérgicas del etanol (naltrexona) y los receptores dopaminérgicos (tiapride).
3. Disminuir la intensidad de los síntomas de abstinencia condicionados a las situaciones de consumo y que incrementan el deseo de beber (acamprosato).
4. Aumentar la capacidad de control (naltrexona).
5. Disminuir la sintomatología depresiva, que puede preceder a la recaída (antidepresivos).

Uno de los fines de la terapia farmacológica para el alcoholismo es el evitar o reducir el consumo de alcohol y las recaídas. Para ello se han empleado diferentes

sustancias, entre ellas los antagonistas opioides, los cuales, con base en la afinidad por sus receptores, pueden ser inespecíficos (naloxona, naltrexona) o específicos (nalmefene,  $\beta$ -funaltrexamina, clocinnamox, naltrindole, naltriben, norbinaltorfimina). El uso de estas sustancias se basa en sus propiedades de bloqueo de los receptores opioides, reduciendo así las propiedades reforzantes del alcohol. Los antagonistas opioides más estudiados y usados en clínica son los inespecíficos, de los cuales se sabe que tienen un efecto importante sobre el consumo del alcohol (Coonfield et al., 2002), la tasa de recaídas y el deseo compulsivo de beber alcohol en pacientes alcohólicos.

La naltrexona (Figura 2) deriva de la naloxona, un antagonista opioide sin propiedades de agonista. La actividad de la naltrexona es debida tanto al fármaco como a su metabolito el 6- $\beta$ -naltrexol, con una vida media de  $2,7 \pm 1,0$  h (Gonzalez & Brogden, 1988). La naltrexona en el caso del alcohol, afecta al deseo de beber que aparece antes y durante la ingesta etílica. El alcohol provoca un aumento de la actividad opioide que, a su vez, provoca un aumento de la actividad dopaminérgica en el NAc. Esto, a su vez, es la base de la capacidad del alcohol para producir refuerzo y para provocar instantáneamente un aumento del deseo de seguir consumiendo y que los pacientes perciben como pérdida de control tras las primeras consumiciones. Mediante el bloqueo de los receptores opioides los consumos iniciales de alcohol perderían su capacidad de refuerzo y, además, tras una primera consumición el paciente no perdería el control cayendo en un consumo masivo.

Siempre dentro de tratamientos con abordaje psicoterápico, integral e individualizado para cada paciente, los diferentes estudios realizados hasta la actualidad coinciden en que la naltrexona es eficaz, y bloquea el descontrol sobre el consumo y la progresión a la recaída en aquellos pacientes que inician la ingesta de alcohol durante el tratamiento de deshabitación (O'Malley, 1996).



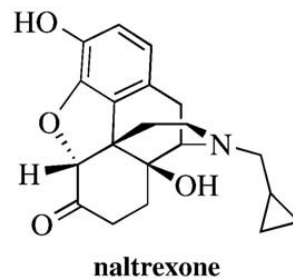


Figura 2: Estructura molecular de la naltrexona

En la actualidad se está estudiando el uso de la naltrexona en otras patologías, como por ejemplo en la esclerosis múltiple (Cree et al., 2010; Sharafaddinzadeh et al., 2010) y en la fibromialgia (Younger & Mackey, 2009) existen ensayos clínicos donde empleando bajas dosis de naltrexona (3-4,5 mg/día) se han observado mejoras en estos pacientes.

### 3.2.1. Mecanismo de acción de la Naltrexona.

El mecanismo de acción de la naltrexona es bloquear la unión del ligando opioide con su receptor reduciendo las propiedades reforzantes del alcohol, disminuyendo de esta forma su consumo (Gardell et al., 1996; Parkes & Sinclair, 2000; Pettinati et al., 2006). Se ha descrito que la atenuación de las propiedades reforzantes del etanol por antagonistas opioides puede relacionarse con la inhibición de la acción de endorfinas endógenas en el NAc (Weiss & Porrino, 2002) y con el bloqueo de la acción opioide sobre las neuronas que modulan la actividad dopaminérgica en el ATV (Weiss et al., 1993; Lee et al., 2005). A su vez se ha observado que la naltrexona tiene efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores tanto *in vitro* como *in vivo*. (Ray et al., 1992; Greeneltch et al., 2004).

Se han postulado diferentes mecanismos que explican la acción antiinflamatoria de la naltrexona:

- La naltrexona podría inducir intermediarios desconocidos cuya función sería inhibir directamente al TNF- $\alpha$ , producido desde los macrófagos.

- La inducción por la naltrexona de la producción de diferentes citoquinas antiinflamatorias como las interleuquinas 10, 4 y 3 (IL-10, IL-4 e IL-3), las cuales disminuirían la producción de TNF- $\alpha$  (Dinarello, 1997).

El óxido nítrico se puede combinar con el anión superóxido para formar anión peroxinitrito una de las especies reactivas de nitrógeno más potentes, el cual se descompone para formar radicales hidroxilo (Beckman et al., 1990). Ambos, anión peroxinitrito y radicales hidroxilo, son responsables de la iniciación de la peroxidación lipídica celular, oxidación de proteínas y daño en la función mitocondrial, lo cual puede causar daño a los tejidos e inducir muerte celular (Kukreja & Hess, 1992; Kukreja & Janin, 1997). Existen estudios que han observado que la administración de naltrexona reduce la infiltración de linfocitos polimorfonucleares en hígado, los cuales indirectamente hubieran podido causar daño oxidativo, sugiriendo que algunos de los efectos beneficiosos de la naltrexona dependen de sus propiedades antioxidantes (Wang et al., 2008).

Pero en la actualidad aún no se conoce con exactitud si la naltrexona tiene propiedades antioxidantes por ella misma, o si es a través de mecanismos secundarios.

#### **4. Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB).**

CREB es uno de los factores de transcripción que está unido como dímero al elemento de respuesta del AMPc (CRE), una secuencia específica del DNA. El sitio de CRE se encuentra en el interior de una región reguladora (promotora o potenciadora) de numerosos genes, si un promotor contiene CREs, entonces podría ser sujeto de regulación por CREB, dependiendo de múltiples factores específicos del tejido, incluyendo la conformación de la cromatina cercana. Tradicionalmente se ha pensado que los dímeros CREB estaban unidos a su sitio CRE en condiciones basales, pero en la actualidad se sabe que son inactivos. Según este punto de vista, eventos en la membrana neuronal, los cuales estimulan la cascada de señalización

intracelular, causan la fosforilación de ambos miembros del dímero de CREB y provocan su actividad transcripcional (Mayr & Montminy, 2001) (Figura 3).

La proteína CREB se expresa en todas las células del cerebro, es un miembro de la familia de proteínas que actúan como factor de transcripción. Se localiza en el interior del núcleo, factores de transcripción como CREB son cruciales para unir estímulos de transcripción: transmisión de eventos que ocurren en la membrana celular hacia alteraciones en la expresión de genes. Por esta razón la alteración de la expresión génica de esta proteína, como regula la expresión de prácticamente todos los tipos de proteínas neuronales, puede tener como efecto último afectar a la función de neuronas individuales y a circuitos neuronales (Carlezon et al., 2005).

Numerosas rutas de señalización intracelular (Figura 3) están envueltas en la transmisión de información desde el receptor de membrana que media su acción hasta el núcleo, donde interactúan con CREB para provocar procesos que culminan en la transcripción de genes. Los efectores de las rutas de señalización implican a la adenilato ciclasa (AC), al AMPc,  $\text{Ca}^{2+}$  y MAPK (*mitogen activated proten kinase*).

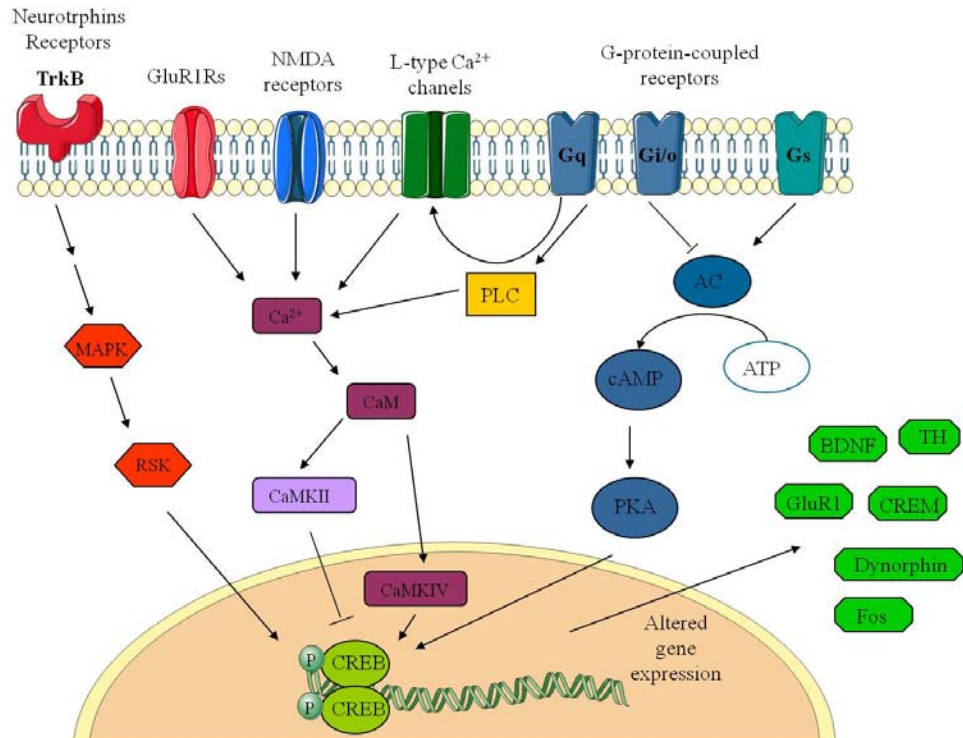


Figura 3: **Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB.** (Adaptado de Carlezon W.A. et al. (Carlezon et al., 2005).

Cambios en la fosforilación de CREB y otros factores de transcripción dependientes de AMPc regulan la transcripción de genes que son dependientes de la activación de su elemento de respuesta a AMPc (CREs) (Guitart et al., 1992; Lane-Ladd et al., 1997).

#### **4.1 Modulación de la expresión de CREB por el alcohol.**

Algunos estudios han demostrado que el consumo crónico de etanol disminuye la actividad de la adenilato ciclasa y disminuye la expresión y función de la proteína G estimuladora ( $G_s$ ) e incrementa la proteína G inhibidora ( $G_i$ ) en roedores (Wand & Levine, 1991). También se sabe que la fosforilación mediada por PKA está disminuida en el cerebro de ratas tratadas de forma crónica con etanol si se compara con ratas controles (Rius et al., 1988). Al igual que varios componentes de la cascada de transducción de AMPc están disminuidos en el cerebro de los roedores durante la dependencia al etanol (Wand & Levine, 1991), es posible que la función del gen de factor de transcripción CREB esté alterada durante la dependencia al etanol.

CREB juega un papel central en los procesos de adicción (Nestler, 2001; Carlezon et al., 2005; Spanagel, 2009). El etanol sigue un perfil farmacológico muy complejo y varios sistemas de señalización han sido identificados como moduladores de la función de CREB, el cual se podría utilizar como “target” del etanol (Spanagel, 2009).

Diversos estudios se han centrado en el papel de CREB y sus genes diana, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neuropéptido Y (NPY), la actividad reguladora asociada a citoesqueleto (Arc) y el factor liberador de corticotropina (CRF), en el desarrollo de la adicción al alcohol (Heilig & Koob, 2007; Davis, 2008; Pandey et al., 2008; Thorsell, 2008). Se cree que CREB juega un importante papel en los efectos de recompensa y refuerzo de muchas drogas de abuso (Berke & Hyman, 2000; Nestler, 2001; Nestler, 2002). Se sabe que la fosforilación de CREB establece un papel crucial para la síntesis de *novo* de proteínas que participan en el mantenimiento de una normal plasticidad sináptica (Duman et al., 2000; Josselyn et al., 2001).

En un principio existen dos rutas celulares que provocan la fosforilación de CREB. La primera, neurotransmisores que estimulan la generación de AMPc provocan la fosforilación de CREB. Estos neurotransmisores interactúan con receptores específicos de superficie acoplados a proteínas G. Seguido de la activación de la proteína G se activa a la AC y es ésta la que genera la formación de AMPc, este AMPc se une a la subunidad reguladora de la PKA, induciendo la disociación y producción de la subunidad catalítica de ésta. La subunidad catalítica de PKA se transloca al interior del núcleo y es donde ésta fosforila a CREB en su serina 133.

En la segunda ruta propuesta, CREB puede ser fosforilado a través de rutas independientes a AMPc, por ejemplo la activación de la proteína kinasa Ca/calmodulina (Cam Kinasa IV) por calcio-calmodulin produce la fosforilación de la serina 133 de CREB (Figura 3). La ruta del segundo mensajero AMPc parece ser una importante diana para los efectos tanto de la exposición aguda como crónica al etanol en cerebro y otras células del organismo (Hoffman & Tabakoff, 1990).

La exposición aguda de etanol está asociada con la inducción de la fosforilación de CREB. En cambio a diferencia de lo que ocurre con la exposición aguda, tratamiento prolongado con etanol no es capaz de inducir la fosforilación de CREB a niveles logrados durante la exposición inicial al etanol. El equilibrio entre CREB y su forma fosforilada depende del contenido nuclear de kinasas capaces de fosforilar a CREB y de fosfatasas capaces de defosforilar a CREB. Es plausible que la exposición crónica a etanol induzca actividad fosfatasa en el núcleo. Algunas proteínas serin/treonin fosfatasas han sido identificadas en células eucariotas, estas fosfatasas son capaces de defosforilar a la serina-133 de CREB (Hagiwara et al., 1992; Wadzinski et al., 1993).

Alternativamente es posible que la exposición crónica a etanol provoque una reducción nuclear de los niveles de kinasas que fosforilan a la serina 133 de CREB, y por tanto reducir la transcripción del gen, en este aspecto, la unidad catalítica de PKA (PKA-C) y la unidad catalítica de cam kinasa IV son posibles candidatas. En algunos estudios han observado que la exposición crónica a etanol reduce la expresión nuclear de estas kinasas en el cerebelo de rata. Para PKA-C, esto podría ser debido por la desensibilización de la cascada adenil ciclasa por la administración

crónica de etanol. También es posible que el consumo crónico de etanol produzca un descenso en la biosíntesis de PKA, provocando degradación o inhibición de la translocación de la kinasa del citosol al núcleo. Existen precedentes de la habilidad del etanol para alterar el tráfico de proteínas (Diehl, 1992).

Además de la reducción de la fosforilación de CREB, la exposición crónica al etanol también altera la actividad de unión de CREB. De aquí se podría predecir que como el etanol produce alteraciones en la fosforilación de CREB y en actividad de la unión de CREB esto reduciría la expresión de genes dependientes de CRE.

### **5. Factor Neurotrófico derivado de Cerebro.**

BDNF es un miembro de la familia del grupo de cisteínas, sustancias neurotróficas que también incluyen a NGF (factor de crecimiento neural), neurotrofinas (NT-3) y NT4/5 en mamíferos. NGF es un factor de supervivencia de neuronas simpáticas y colinérgicas en el SNC. BDNF y NT-4 están ampliamente expresadas en hipocampo, cerebelo y corteza. BDNF puede estar producida por astrocitos bajo condiciones patológicas (Zafra et al., 1992; Juric et al., 2006), BDNF también es producido por plaquetas (Karege et al., 2002) linfocitos (Krause et al., 2008) y por el endotelio vascular. Es un factor angiogénico, y además está relacionado con la respuesta vascular y hemodinámica del etanol.

Las neurotrofinas inician eventos de señalización que subyacen al aprendizaje, memoria y plasticidad neuronal (Fischer et al., 1987; Alonso et al., 2005). La síntesis y liberación de neurotrofinas depende de la actividad, lo cual es consistente con su papel como modulador de la resistencia y mantenimiento de la sinapsis (Canossa et al., 1997; Lessmann, 1998).

Las neurotrofinas inician su señalización por la unión a receptores de baja (p75) o de alta (trk) afinidad. Las isoformas de los receptores de alta afinidad son trkA y trkB, a éstas se unen de forma preferente el factor de crecimiento neural (GNF) y BDNF respectivamente (Bibel & Barde, 2000; Huang & Reichardt, 2003).

La expresión del gen de BDNF está controlada a través de cuatro promotores. Es de particular interés que la expresión de uno de ellos está regulada

por la actividad neuronal a partir del flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático activa la transcripción de BDNF a través de una cascada de señalización de protein-quinasas que conllevan la activación de de diversos factores de transcripción, incluyendo CREB. BDNF está inducido por la actividad neuronal y está implicado en el desarrollo, crecimiento de neuritas, plasticidad sináptica, y regulación de la morfología dendrítica (Poo, 2001; Kuczewski et al., 2009). La activación de TrkB provoca la internalización del receptor y su unión a proteínas adaptadoras, Grb2 y SOS, las cuales interaccionan con la proteína Ras, provocando la activación de MAPK (Poo, 2001; Reichardt, 2006). La señalización de BDNF, especialmente a través de MAPK, finaliza en la activación de CREB (Tao et al., 1998; Pizzorusso et al., 2000). Además BDNF y TrkB son genes diana de CREB.

## **6. Neurogénesis en el hipocampo adulto.**

La neurogénesis es la producción de las células SNC, es decir, de neuronas y células gliales. El término neurogénesis se aplica especialmente a los seres humanos, si bien se da lógicamente en cualquier animal que posea sistema nervioso y, por tanto, células nerviosas.

La producción de nuevas neuronas en periodos posteriores al nacimiento fue negada hasta bien avanzada la segunda mitad del siglo XX (Ramón y Cajal, 1928). Hoy en día se sabe que tanto las neuronas como las células gliales se siguen produciendo por la diferenciación de células madre durante toda la vida de los organismos (Kuhn et al., 1996).

Desde el principio de 1990 numerosos estudios han demostrado que nuevas neuronas se forman en áreas restringidas en el SNC adulto (Gage, 2000; Kempermann & Gage, 2000; Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002). En humanos la generación de nuevas neuronas se ha constatado y descrito en diferentes zonas del sistema nervioso: en bulbo olfatorio, en hipocampo y en diferentes áreas de la corteza cerebral (Kempermann & Gage, 2000; Lledo et al., 2006). También se ha descrito esta neurogénesis en la región prefrontal, que controla el proceso de ejecución de decisiones y que está involucrada en la memoria a corto plazo; también en la región temporal inferior, que actúa en el reconocimiento de caras u objetos y

en la región parietal posterior, importante en la percepción de relaciones espaciales y de la imagen corporal.

La integración de neuronas en redes neuronales sigue estas fases (Figura 4): 1) proliferación de la célula madre, 2) desarrollo de una célula progenitora, 3) diferenciación a una neurona inmadura, 4) migración a su destino final, 5) desarrollo de axones y dendritas y formación de sinapsis con otras neuronas del circuito, 6) y al final, maduración a una neurona de pleno funcionamiento. Aunque estos pasos son iguales a las neuronas formadas en el desarrollo embrionario, la diferencia mayor es que las neuronas formadas en la neurogénesis adulto tienen que hacer todo estos pasos en un entorno madurado y tienen que incorporarse a circuitos ya existentes.

Estudios actuales muestran que el flujo se ve modificado ante la presencia de tumores cerebrales o ciertas dolencias. Se sabe que las corrientes de neuronas varían su destino para irrigar las zonas tumorales, pero actualmente se discuten temas como la velocidad de corriente o el papel de las corrientes neuronales en los tumores cerebrales (Guzman-Marin et al., 2007).



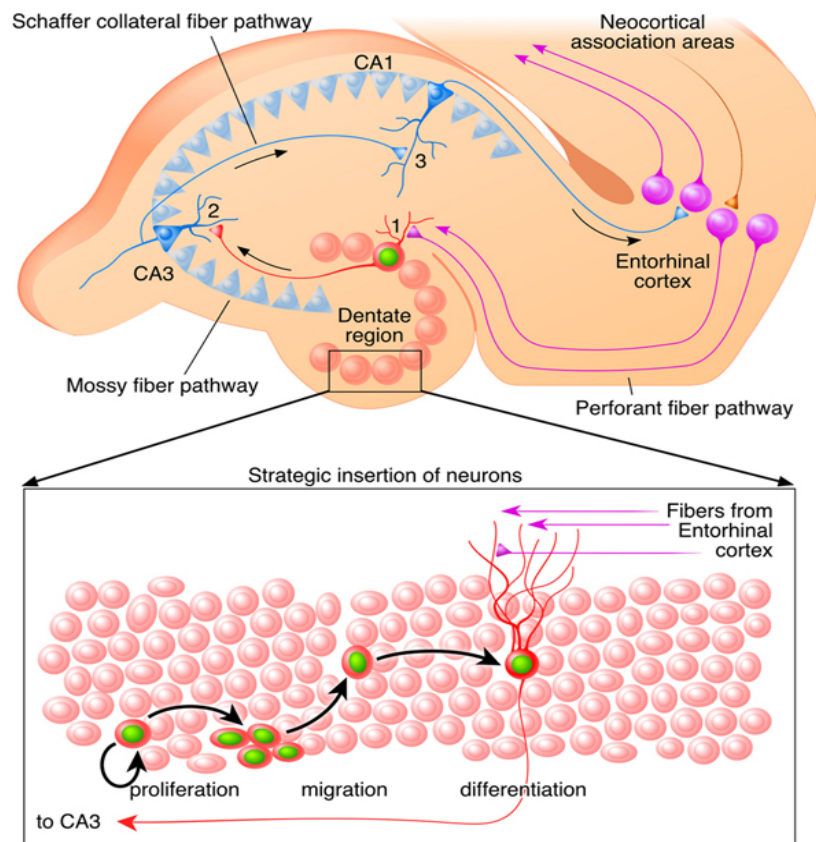


Figura 4. **Neurogénesis en el giro dentado del hipocampo adulto.** 1. Proliferación: Células madre (rosa) en la capa subgranular del giro dentado estimulan a células que se diferencian en neuronas inmaduras. 2. Migración: Neuronas inmaduras migran a la capa subgranular del giro dentado. 3. Integración: Neuronas inmaduras maduran a nuevas neuronas granulares gracias a estímulos del córtex entorrinal y extienden sus proyecciones a CA3. Adaptado de Lie et al. (Lie et al., 2004)

El hecho que nuevas neuronas se forman durante toda la vida en el SNC, no solamente proporciona un modelo único para entender el mecanismo básico del desarrollo neuronal en el SNC adulto, sino que además abre la posibilidad de poder estimular este proceso como una nueva estrategia para la terapia de patologías del SNC.

## **6.1 Marcadores de supervivencia y proliferación.**

### **6.1.1 Bromodeoxiuridina (BrdU).**

La bromodeoxiuridina (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) es un nucleótido sintético análogo de la timidina. La técnica de BrdU es comúnmente utilizada en la detección de células en división en tejidos vivos ya que el BrdU puede incorporarse a la nueva síntesis de ADN en la proliferación de las células (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. Se utilizan anticuerpos específicos para BrdU para detectar los productos químicos incorporados por lo que células marcadas con BrdU se encontrarían en fase de proliferación celular (Gross, 2000). La unión de los anticuerpos requiere de la desnaturalización de ADN, en general, por exponer las células a ácido o calor.

Debido al hecho de que el BrdU puede reemplazar la timidina durante la replicación del ADN, puede causar mutaciones, por lo que sólo se usa en animales de experimentación.

En la actualidad el uso de bromodeoxiuridina es una de las principales técnicas para el marcaje de la proliferación neuronal para así, caracterizar las alteraciones de este fenómeno que se producen durante determinadas patologías. Rao et al., estudió la disminución de la neurogénesis en ratas adultas y como se producía también una disminución significativa del aprendizaje (Rao et al., 2006). Actualmente se ha descrito la disminución de la neurogénesis en el giro dentado en enfermedades como infartos de miocardio e isquemias (Kuan et al., 2004), diabetes (Saravia et al., 2004) alcoholismo (Herrera et al., 2003) y como la administración de diferentes antioxidantes es capaz de proteger este proceso (Herrera et al., 2003; Chucair et al., 2007).

### **6.1.2. Doblecortina.**

La doblecortina (DCX) es un marcador endógeno para estudiar la neurogénesis adulta y la morfología de las neuronas recién formadas (Rao & Shetty, 2004). DCX se expresa en las células tempranas que están destinadas a convertirse en neuronas (Brown et al., 2003). DCX es una fosfoproteína asociada a los

microtúbulos del citoesqueleto que contribuye a la reorganización de los microtúbulos, y está expresada tanto en citoplasma como en las dendritas de los nuevos neuroblastos durante la elongación dendrítica y arborización neuronal. El desarrollo completo del árbol dendrítico indicado por una arborización hacia el exterior de la capa molecular sugieren que las neuronas han madurado y se están integrando de forma correcta en la circuito hipocampal, lo cual es un proceso requerido para una función correcta del hipocampo (Rihn & Claiborne, 1990; Schmidt-Hieber et al., 2004).

La expresión de DCX empieza de forma temprana durante las primeras horas después de la división celular y permanece durante un periodo de unas pocas semanas (Figura 5), durante este tiempo las células migran, se diferencian y extienden sus árboles dendríticos, transformándose gradualmente en neuronas. Tan pronto como la células se convierte en neurona madura y empieza la expresión de NeuN, la inmunoreactividad de DCX decrece drásticamente (Brown et al., 2003).

Por ello, el patrón marcado por DCX es útil para el estudio de los cambios morfológicos de las neuronas recién formadas. Además como es un marcador endógeno, proporciona una validación independiente de la proliferación de las células progenitoras neuronales y de neurogénesis.

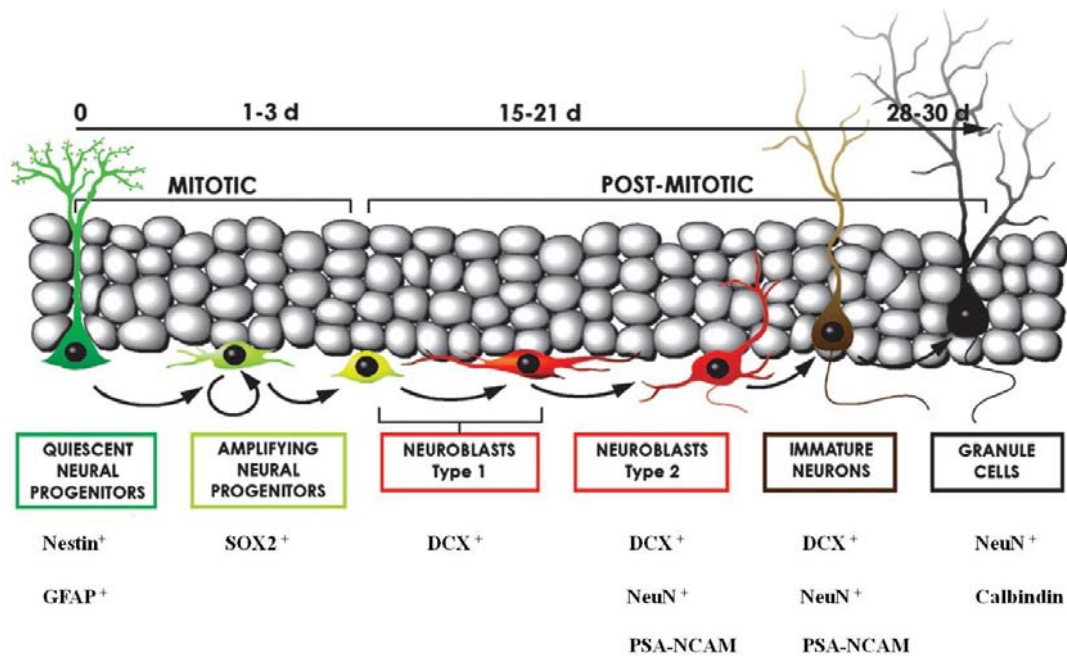


Figura 5: Esquema de la cascada de diferenciación neuronal. Adaptado de (Encinas et al., 2006).

## 6.2 Neurogénesis y etanol.

Se ha demostrado que numerosos factores, tanto endógenos como exógenos, regulan las diferentes etapas de la neurogénesis adulta. Factores hormonales y neuroendocrinos, neurotransmisores y factores de crecimiento, estrés, actividad física, el aprendizaje y la memoria, la complejidad ambiental y agentes farmacológicos, incluyendo sustancias de abuso, se han visto implicados de una manera o de otra en la regulación de la neurogénesis en el sistema nervioso central del adulto (Ming & Song, 2005; Christie & Cameron, 2006). El hecho demostrado de que la exposición a drogas de abuso afecta de forma negativa a la capacidad de autorrenovación del hipocampo adulto aporta crecientes especulaciones del papel potencial que tiene la adicción sobre la neurogénesis, como es el caso de la cocaína (Canales, 2007).

El alcohol ha sido una de las drogas más estudiadas estos últimos años. Investigaciones iniciales indicaban que la administración aguda disminuía la proliferación celular en el giro dentado (GD) (Nixon & Crews, 2002). Los mismos autores observaron que el daño en la proliferación después del consumo agudo de

etanol era seguido de un aumento brusco en la proliferación una semana después de la exposición al alcohol, y un incremento en la expresión de doblecortina en el GD dos semanas después del tratamiento (Nixon & Crews, 2004). Esos datos sugieren que existe una compensación y reversibilidad de los efectos de la administración aguda de etanol sobre la proliferación celular después de la abstinencia.

Tras la administración crónica de etanol la neurogénesis, en concreto la supervivencia de las nuevas células formadas, y la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo está alterada significativamente en ratas tratadas crónicamente con dieta líquida que contiene etanol (Herrera et al., 2003; Johnsen-Soriano et al., 2007a). En estos trabajos se implica al estrés oxidativo como un factor que contribuye a la muerte celular y como la administración de un antioxidante como es el ebselen previene la toxicidad producida por el etanol en las células del hipocampo. A su vez el tratamiento crónico con etanol produce un déficit progresivo en el aprendizaje y en la memoria, tal como se ha observado en una gran variedad de estudios de comportamiento (Walker & Freund, 1971; Walker & Freund, 1973; Fehr et al., 1976).

El déficit en las funciones cognitivas dependientes del hipocampo ha sido observado después de una exposición crónica a las dietas líquidas que contienen alcohol. Estos modelos reproducen también muchos de los efectos del alcoholismo observados en humanos, incluyendo cambios en el hígado, efectos gastrointestinales y neuropatías periféricas (Lieber et al., 1989). Conociendo los cambios que ocurren en el cerebro causados por el alcohol es posible desarrollar nuevas terapias de intervención.

## **7. Estrés oxidativo. Radicales libres.**

Se define estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1991). La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes.

Se denominan radicales libres a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital

necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena.

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RL) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido y el radical hidroxilo) por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Estas dos denominaciones (RL y ROS), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales, como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso. Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a los radicales libres, las ROS o los oxidantes.

Existen también las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo es por sí mismo un radical, pero además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, ROS, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de RNS como el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), trióxido dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), dióxido de nitrógeno (.NO<sub>2</sub>), o nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan (Hausladen & Stamler, 1999). Esta situación puede ocurrir in vivo en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante activación de receptores NMDA (Klatt & Lamas, 2000).

Los radicales libres, como se describe a continuación, intervienen tanto en situaciones fisiológicas como patológicas en el organismo vivo.

### **7.1 Papel fisiológico de los radicales libres.**

Se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Satriano et al., 1993; Zimmerman et al., 2002; Hardy & Hunt, 2004; Al-Shabrawey et al., 2008). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, (Fillebeen & Pantopoulos, 2002; Minamiyama et al., 2007) o, contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon et al., 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Svensk et al., 2004; Gupta et al., 2007). El óxido nítrico interviene en la regulación de funciones en los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso (Mayer & Hemmens, 1997).

### **7.2 Papel patogénico de los radicales libres.**

Los radicales libres pueden relacionarse, entre otros, con la hipertensión (Touyz, 2004) la disfunción cardiovascular (Ramachandran et al., 2003a), la inflamación (Telfer & Brock, 2004), y enfermedades como la diabetes (Arnal et al., 2010); Miranda, 2007 #63; Muriach, 2006 #62; Miranda, 2004 #64; Hermenegildo, 1993 #65], el SIDA (Jareno et al., 2002) etc. Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas) y pudiendo producir en último término apoptosis y muerte neuronal (Li et al., 2002; Torchinsky & Toder, 2007; Paravicini & Touyz, 2008).

### **Generación de radicales libres.**

Los RL y ROS proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas & Blattna, 1986).
2. Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig & Babior, 1979).
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard PG, 1999).
4. La deslocalización de metales de transición ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$ ) de sus sitios de depósito (Halliwell & Gutteridge, 1986).
5. La hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers et al., 1985).
6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman & Brent, 1990).
7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996)

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).
2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell & Gutteridge, 1986).
3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).

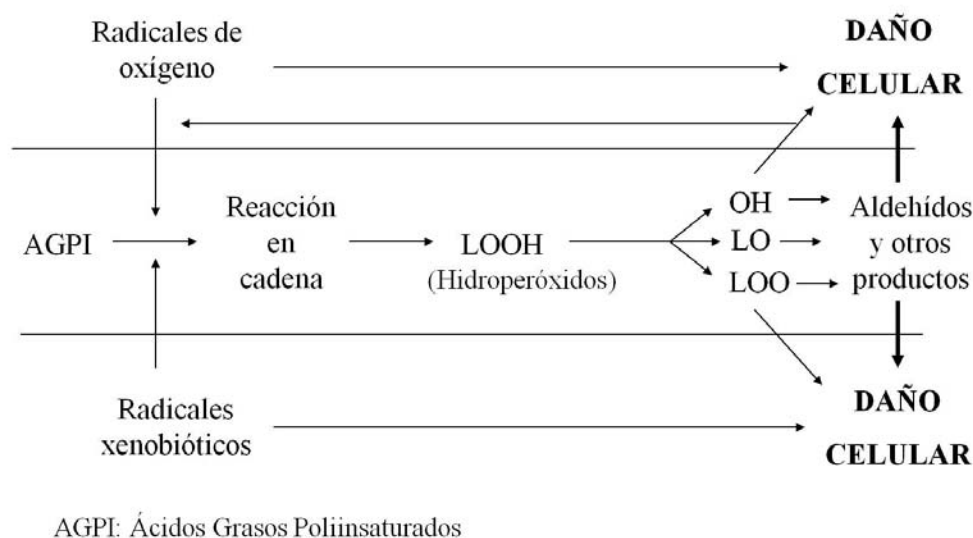
### **7.3 Peroxidación lipídica.**

Consiste en el deterioro oxidativo de grasas oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados. Generalmente ocurre cuando el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ ) es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico.

Un  $\bullet\text{OH}$  puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar



nuevas cadenas de peroxidación. Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la mayor importancia de los RL (Figure 6).



**Figura 6.** Esquema de mecanismos implicados en la lipoperoxidación. Modificado de (Janero, 1990).

### 7.3.1 Productos de la peroxidación de lípidos.

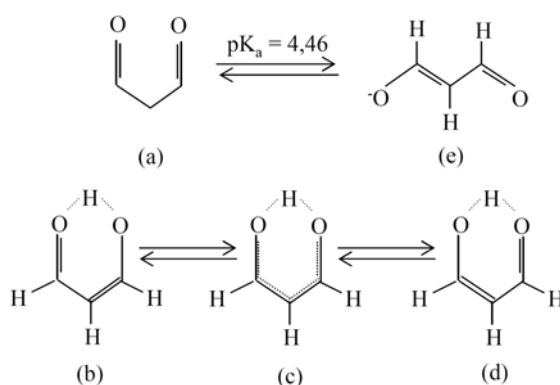
Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi alquenos, en particular el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 4-hidroxihexenal (Esterbauer et al., 1991).

#### Malondialdehído (MDA).

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular ( $PM = 72,07$ ), con un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido (Figura 7). En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas.

Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico. Han sido varias las rutas hipotetizadas para esta formación (Pryor & Stanley, 1975; Wilson, 1979), pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el

MDA. Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso (Halliwell, 2000; Bunnag, 2006; Surekha et al., 2007).



**Figura 7.** Estructura química del MDA, (Janero, 1990).

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de productos remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado mayoritariamente técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico. La literatura señala a la determinación de MDA por HPLC como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica, siendo ésta precisamente la utilizada en nuestro estudio.

#### 7.4 Defensas antioxidantes.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1986). El término “sustrato oxidable” incluye casi toda macromolécula que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.

La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes (vitaminas C y E, glutatión, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies reactivas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies, 1991).

#### **7.4.1 El sistema glutatión.**

Se denomina sistema glutatión, al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister & Anderson, 1983). El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace  $\gamma$ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister & Anderson, 1983). Es el tiol no proteico más abundante en prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar por su función de protección frente a la toxicidad del oxígeno. Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower & Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El término estado no implica unos valores constantes para el glutatión, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema. El glutatión está relacionado con la actividad de algunas enzimas como:

**-Actividad peroxidasa** representada por tres enzimas:

1. Glutathion peroxidasa (GPx): es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) a agua. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutathion peroxidasa. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima (Van Vleet et al., 1981).

2. Glutathion transferasa con acción peroxidasa: Algunos isoenzimas de la glutathion S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno. Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutathion peroxidasa está disminuida mientras que la actividad glutathion transferasa está aumentada (Schramm et al., 1985).

3. Glutathion peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos oxidados de membranas biológicas. Es un monómero y ha sido descubierto como una seleno enzima distinta de la clásica GPx basándose en su cDNA y secuencia aminoácida.

### **Glutathion mitocondrial.**

El GSH es sintetizado en el citosol celular y su disponibilidad en los diferentes compartimentos celulares está determinada por complejas interacciones entre su utilización, transporte, síntesis y la tasa de reducción del GSSG a GSH. El glutathion mitocondrial (mGSH) constituye entre un 10-15% del total celular y se encuentra en una concentración similar a la del citosol (Romero & Sies, 1984; Romero et al., 1984; Garcia-Ruiz et al., 1994).

Las principales funciones del mGSH son:

- Reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado en la respiración mitocondrial.  
Como consecuencia del metabolismo aeróbico celular se generan radicales superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como subproductos de la respiración mitocondrial, especies reactivas que pueden conducir a la oxidación de lípidos de membrana y otras macromoléculas, interfiriendo en procesos metabólicos. Puesto que la mitocondria carece del enzima catalasa, la detoxificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> depende exclusivamente del glutatión mitocondrial y de la actividad de la enzima GPx (Fernandez-Checa et al., 1997).
  
- Mantenimiento de la viabilidad celular.  
El mGSH tiene un papel fundamental en la viabilidad celular (Fernandez-Checa et al., 1998a). Por ejemplo, se ha observado que la disminución selectiva de los niveles de mGSH es un evento que precede a la muerte apoptótica en timocitos (Macho et al., 1997) y sensibiliza a los hepatocitos frente al estrés oxidativo y TNF- $\alpha$  (Colell et al., 1997), Fernandez-Checa J.C. et al. 1998). Además juega un papel clave en el mantenimiento de la funcionalidad mitocondrial a través de la regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, manteniendo los grupos sulfidrilos en estado reducido (Armstrong et al., 2002).

### **7.5 Alcoholismo y estrés oxidativo.**

El etanol es un tóxico de consumo muy difundido en nuestro entorno, pudiendo ejercer la acción tóxica bien por su efecto directo mediante la generación de radicales libres o a través de sus metabolitos, fundamentalmente el acetaldehído (Nordmann, 1994).

El hígado es el principal órgano diana de la toxicidad del etanol y ha sido confirmada de forma repetida la implicación del estrés oxidativo en la patogénesis de la enfermedad alcohólica en este tejido (Rouach et al., 1997). Uno de los

mecanismos para explicar el origen de este estrés oxidativo es la generación de radicales libres en el metabolismo del etanol por la molécula citocromo P450 inducible por etanol (isoenzima CYP2E1), en el que se generan cantidades apreciables de radical superóxido y peróxido de hidrógeno (Lieber, 1997; Lieber, 2004), y de radical 1-hidroxietilo (Albano et al., 1987).

Otra fuente de radical 1-hidroxietilo procede de la oxidación del etanol en presencia de trazas de hierro por peróxido de hidrógeno (McCord, 1998). Después del consumo crónico del etanol, hay una inducción de CYP2E1, que se asocia tanto a un aumento del metabolismo del etanol, como a una inactivación de xenobióticos a metabolitos tóxicos (Lieber, 2004).

Así, se ha demostrado experimentalmente que la ingesta crónica de etanol conduce a un aumento de los productos de la peroxidación lipídica y un descenso de factores antioxidantes como el glutatión y enzimas derivados (Schlorff et al., 1999). Además el consumo de alcohol ha sido relacionado con la conversión de la deshidrogenasa xantina a oxidasa xantina, proceso que puede generar estrés oxidativo (Sultatos, 1988). El etanol también causa daño a las mitocondrias, resultando en un descenso en la producción de ATP (Koch et al., 2004).

De igual manera se ha relacionado al estrés oxidativo como principal factor implicado en las alteraciones derivadas de su consumo en forma crónica, tanto del sistema nervioso central, cerebro (Johnsen-Soriano et al., 2007a), cerebelo (Rouach et al., 1997) como periférico (Bosch-Morell et al., 1998). Diversos estudios (Tabuchi et al., 1995; Kono et al., 2001) han demostrado que el uso de antioxidantes puede prevenir los daños hepáticos y en la mucosa gástrica provocados por el alcohol. También, a nivel nervioso se han utilizado antioxidantes para reducir neuropatías inducidas por etanol (Bosch-Morell et al., 1998; Johnsen-Soriano et al., 2007a).

## **8. Mitocondria.**

Las mitocondrias son orgánulos citoplasmáticos especializados en la transformación de la energía de oxidación en energía quimioosmótica, lo que se traduce en la síntesis de ATP a partir de ADP. Además de proporcionar la energía necesaria para que las células lleven a cabo sus múltiples funciones, en estos últimos

años se ha puesto de relieve su papel en la regulación de la muerte celular, al actuar como almacén de diferentes proteínas apoptogénicas.

### **8.1. Estructura y composición.**

Las mitocondrias son orgánulos móviles y plásticos, de un diámetro comprendido entre 0.5-1  $\mu\text{m}$ , y su asociación con los microtúbulos determina la orientación y distribución típica observada en el citoplasma de diferentes tipos celulares.

La estructura básica de la mitocondria consiste en dos membranas altamente especializadas, una externa que está en contacto con el citoplasma, y una interna caracterizada por invaginaciones denominadas crestas que penetran en la matriz mitocondrial (Figura 8). Ambas membranas delimitan dos compartimentos diferentes; el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Smoly et al., 1970). En el espacio intermembrana, aparte de residir diferentes proteínas proapoptóticas, se encuentra la enzima adenilatoquinasa que transforma el AMP en ADP, el cual es rápidamente fosforilado a ATP. Gracias a esta enzima, el AMP citosólico puede ser utilizado para la regeneración de ATP. Por otra parte, la matriz mitocondrial contiene la maquinaria implicada en la síntesis proteica (ADN, ARN y ribosomas) y es donde tienen lugar las reacciones del ciclo de Krebs.

La membrana externa presenta analogías de composición con la membrana citoplasmática y el retículo endoplasmático. Contiene un 40% de lípidos y un 60% de proteínas, que corresponden principalmente a enzimas como la acil-CoA-sintetasa, la NADH-citocromo-b<sub>5</sub>-reductasa, la monoamino oxidasa y sobre todo el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC). Este canal es el responsable de la membrana externa actúe como un tamiz permeable a moléculas menores de 5000 Da. La mayoría de sustratos no pueden atravesar la membrana interna, provocando que el espacio intermembrana sea equivalente en su composición química al citosol. La composición de la membrana interna difiere en muchos aspectos de la externa, siendo mucho más rica en proteínas (80%) debido a la presencia de gran cantidad de transportadores específicos y de los complejos enzimáticos constituyentes de la cadena respiratoria.

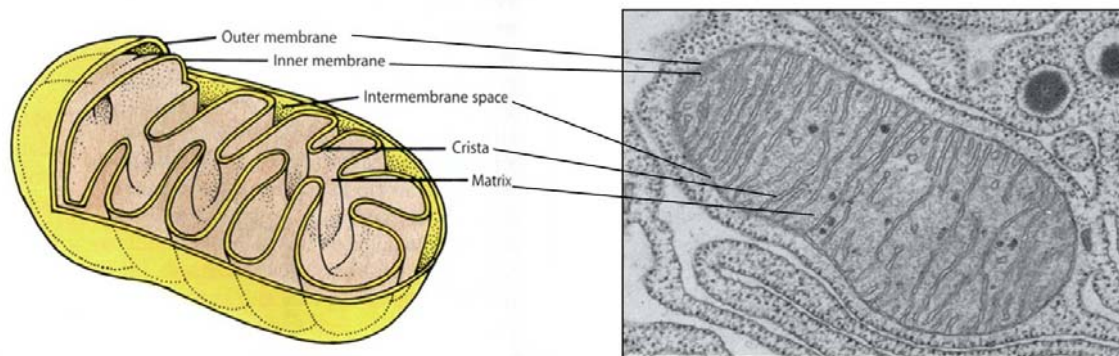


Figura 8: Esquema de la estructura mitocondrial, y mitocondria por microscopio electrónico de transmisión (60.000X).

## 8.2. Transporte y permeabilidad mitocondrial.

Mientras que la membrana externa es permeable a la mayoría de solutos, la membrana interna es impermeable y sólo pueden difundir a través de ella pequeñas moléculas neutras, como por ejemplo: oxígeno, agua, dióxido de carbono... El resto de trasportes pasivos o activos que se realizan a través de esta membrana, están controlados por canales o transportadores específicos (Figura 9).

Para la fosforilación oxidativa, la mitocondria necesita importar desde el citosol, ADP y fosfato inorgánico, mientras que el ATP generado es este proceso es liberado al citosol. Para ello, intervienen dos transportadores presentes en todas las mitocondrias: el translocador de ADP/ATP (ANT) y el transportador de fosfato inorgánico (Palmieri et al., 1993).

La matriz mitocondrial se encuentra cargada negativamente debido al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial, por lo que el transporte de cualquier anión se verá afectado por este potencial de membrana.

El proceso de permeabilidad mitocondrial transitoria o apertura de poro mitocondrial (MPT), se caracteriza por un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a solutos de tamaño menor o igual a 1500Da (Hunter et al., 1976). La apertura de este canal no específico, permite un equilibrio entre los iones de la matriz y del espacio intermembrana mitocondrial, disipando el



gradiente de protones y desacoplando la cadena respiratoria. Además, se produce un hinchamiento de la mitocondria debido a una hiperosmolaridad de la matriz. Como la membrana interna está invaginada en forma de crestas y posee mayor superficie que la membrana externa, al expandirse el volumen de la matriz puede provocar la permeabilidad y/o ruptura de la membrana externa, liberando las proteínas del espacio intermembrana mitocondrial.

La permeabilidad mitocondrial está controlada por un poro dependiente de voltaje y de calcio (Bernardi et al., 1994). Este complejo multiproteico se localiza en los lugares de unión entre la membrana mitocondrial interna y externa, y por tanto, la apertura del poro permite la comunicación entre la matriz mitocondrial y el citosol. No se conoce con exactitud la composición del poro mitocondrial, aunque se han descrito alguno de sus componentes. Entre los que constituyen el núcleo del poro nos encontramos al translocador de adeninas (ANT) y al canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).

Muchos de los agentes que provocan la apertura del poro mitocondrial son ligandos de ANT, el atractilósido es uno de ellos (Halestrap & Davidson, 1990).

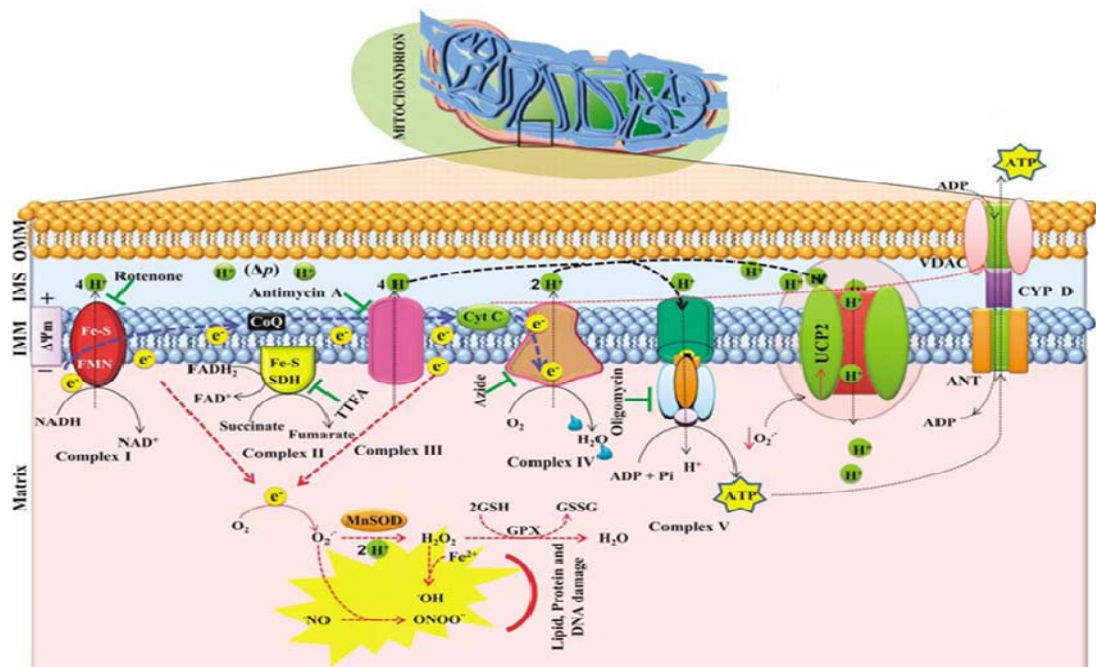


Figura 9: Esquema de los transportadores de las membranas de la mitocondria. Adaptado de Suresh L. et al. 2009.



## **II.- OBJETIVOS**



## **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis del trabajo sobre la que se fundamentan los objetivos del presente estudio plantearía que el mecanismo de acción de la naltrexona (antagonista de receptores  $\mu$ -opioides) por el cual se utiliza como coadyuvante en el tratamiento de la deshabitación al alcohol, estaría relacionado con el estrés oxidativo y con algunas rutas de señalización celular relacionadas con la adicción.

Por ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Caracterizar los cambios inducidos en el cerebro de la rata en un modelo experimental de alcoholismo crónico, estudiando la posible implicación del estrés oxidativo (peroxidación lipídica y concentración y/o actividad de antioxidantes), su relación con rutas de señalización y la neurogénesis.
- 2.- Comprobar el efecto del tratamiento con naltrexona sobre las posibles modificaciones observadas tras el consumo crónico de etanol.



### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**





## **1. Tratamiento de los animales.**

### **1.1 Condiciones de estabulación.**

Para este trabajo se utilizaron rata macho de raza Sprague-Dawley que procedían de una camada original de Harlan (Barcelona). Los animales utilizados se solicitaron teniendo un peso al inicio del experimento de unos 200-220 g. En todos los casos se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

Durante la estabulación, los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 y de 20:00 a 08:00. Durante su estabulación y hasta el inicio del experimento tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Letica (Hospitalet, Barcelona).

### **1.2. Manejo de los animales.**

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Comunidad Económica Europea ("Orden 86/609/CEE") y se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. Los ensayos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU Cardenal Herrera y el número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestésico (ketamina 100 mg/kg peso + azepromazina 2,5 mg/kg peso).

## **2. Diseño experimental.**

A continuación se describe los distintos protocolos de estudio desarrollados en este trabajo de investigación.

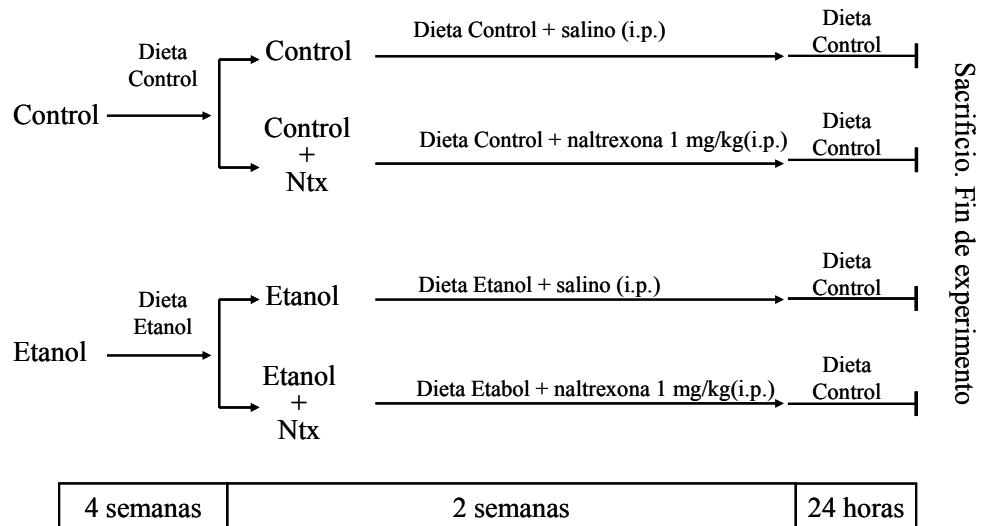
### **2.1 Administración de la dieta líquida.**

Todos los experimentos realizados en este trabajo se basaron en el modelo de rata alcohólica crónica, en el que se administraba a las ratas como alimento la dieta Lieber-De Carli (Lieber et al., 1965) obtenida de la casa comercial Test Diet (Londres). Brevemente, el modelo de alcoholismo crónico consiste en administrar dieta líquida de alcohol (5% v/v) durante seis semanas. Las ratas fueron separadas en dos grupos y se les administraba la dieta líquida alcohol ó dieta líquida control. El grupo control recibió en lugar de alcohol una mezcla isocalórica con maltosa dextrinada sustituyendo al etanol. Las ratas se agruparon en parejas control-etanol con un peso similar, administrando a la rata control el volumen de dieta ingerido por la rata etanol el día anterior. Para acostumbrar a los animales a la dieta alcohólica, se administraba dieta alcohólica diluida con dieta control durante un periodo de siete días aumentando los niveles de alcohol hasta los valores de la dieta completa. Una vez acostumbradas, la cantidad de dieta consumida diariamente oscilaba entre 80-120 ml.

Se realizó una modificación de este modelo con el fin de inducirles 24 horas de abstinencia a las ratas, a todas las ratas que durante 6 semanas se les ha administrado dieta etanol 24 horas antes del sacrificio se les administra dieta control.

### **2.2 Administración de la naltrexona.**

En la semana 5<sup>a</sup> de consumo de alcohol se dividieron las ratas en cuatro grupos; control, control-naltrexona, etanol, etanol-naltrexona. La naltrexona fue administrada diariamente durante las dos últimas semanas de consumo de la dieta, mediante inyección intraperitoneal (1mg/kg). A las ratas que no se les administraba naltrexona, grupos control y etanol, se les inyectó el mismo volumen de suero fisiológico (Figura 10).

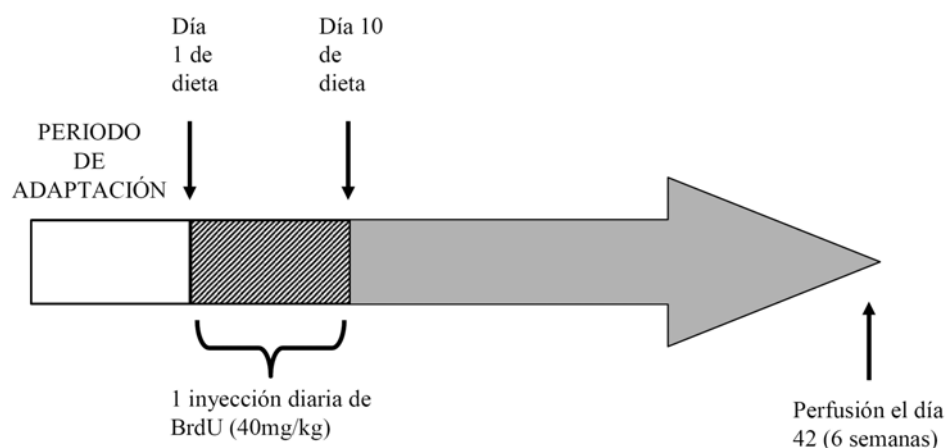


**Figura 10.** Esquema del modelo experimental.

### 2.3 Administración de bromodeoxiuridina (BrdU).

Se siguió el protocolo de administración de BrdU para el estudio de la supervivencia celular según el modelo de supervivencia celular descrito por Herrera et al. 2003, (Figura 11). (Herrera et al., 2003).

Durante los 10 primeros días del experimento los animales recibieron una inyección intraperitoneal diaria de BrdU (40 mg/kg/i.p.), un marcador de la proliferación celular, el último día del experimento se perfundieron los animales como se explica en los apartados siguientes.



**Figura11.** Esquema de la administración de BrdU, modelo de supervivencia. Figura adaptada de Herrera et al. 2003. (Herrera et al., 2003)

### 3. Obtención de muestras.

#### 3.1 Suero.

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal (ketamina 100 mg/kg peso; azepromazina 2,5 mg/kg peso) extrayéndose la sangre directamente del corazón con ayuda de una jeringuilla. A continuación se centrifugó la sangre durante 2 minutos a 9000 rpm y se separó el sobrenadante.

#### 3.2 Hipocampo.

Tras el sacrificio de los animales, se procedió inmediatamente a la extracción del hipocampo. Una vez obtenidas las muestras se homogenizaron en tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7, con un homogenizador UltraTurrax T25. Los homogenados se conservaron a -20° C hasta su utilización para la determinación de proteínas, MDA y actividad glutatión peroxidasa.

Para la determinación de glutatión, inmediatamente después de la homogenización, se acidifican 360  $\mu$ L de este homogenado con 40  $\mu$ L de ácido

perclórico al 20%, se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante, que se conservó a - 20 °C hasta su utilización.

En el caso del estudio inmunohistoquímico, para la obtención de los cortes de cerebro, tras la perfusión de las ratas primero con salino para limpiar los restos de sangre y ya después con la solución fijadora PFA 4% PBS 0.1M, PH 7.4, se extrajo el cerebro completo, y se conservó 12 horas en la misma solución fijadora a 4°C. Posteriormente, se cambiaron a una solución de PBS-Sacarosa 30% entre 24 –48h a 4°C. Y por último se incluyeron en cryobloc compound (DiaPath) y ya se conservan a -80°C. Posteriormente se cortaron al criostato como se explica a continuación.

### **3.3 Extracción mitocondrial.**

Las mitocondrias se extrajeron por centrifugación diferencial del homogenado de cerebro completo de rata. Una vez sacrificada la rata, se extraía el cerebro e inmediatamente se homogeneizaba con un volumen de tampón manitol igual al peso de cerebro más dos veces el peso. El tampón manitol consta de manitol 210mM, sacarosa 60mM, KCl 10mM, succinato de sodio 10mM, EGTA 0.1mM y HEPES 10mM, a un pH de 7,4).

Este cerebro con ese volumen de tampón manitol se homogeniza con el homogeneizador de teflón, 4 veces a 1200 rpm. De este homogeneizado se reserva un mililitro que será utilizado para las determinaciones en el homogenado total de cerebro.

El homogenado restante se centrifuga a 700 g durante 10 minutos a 4°C, se descarta el precipitado, y el sobrenadante se centrifuga a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado obtenido por esta centrifugación se resuspende en tampón manitol teniendo un volumen final de 4 mililitros. Se reparten estos mililitros en dos tubos de ultracentrífuga junto con 8 mililitros de una solución de manitol al 30% de percoll, y se centrifugan a 27.700 rpm durante 35 minutos a 4°C. Después de la ultracentrifugación se observa una banda, correspondiente a la fracción mitocondrial, justo por encima del precipitado de percoll, se extrae esta banda y se lava con el tampón manitol centrifugando a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. El precipitado obtenido se resuspende con un pequeño volumen del tampón manitol, estando ya preparado para las diferentes determinaciones.

#### 4. Procedimientos analíticos.

##### 4.1 Determinación de la alcoholemia.

Para la determinación de la concentración de etanol en sangre se utilizó el kit Ethanol de la casa comercial BIOLABO REAGENTS. Se extraían 100  $\mu$ l de sangre de la cola, para conseguir 10  $\mu$ l de suero y con ese volumen se medía la alcoholemia en mmol/L, mediante medida colorimétrica. El kit se basa en un método enzimático descrito por Gadsen et al. (Gadsen et al., 1986) en el que el etanol se transforma en acetaldehído por la acción de la enzima aldehído deshidrogenasa (ADH) (Gupta et al., 2007), con la formación de NADH. Se mide la absorbancia de NADH, proporcional a la concentración de etanol en la muestra a 340nm.

Se realizaba la medición de la alcoholemia al menos una vez a la semana.

##### 4.2 Determinación de proteínas.

Se realizó según el procedimiento descrito por Lowry (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  4%, NaOH 0.8%
- Solución B:  $\text{CuSO}_4$  1.25 mM,  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  1.42 mM.

Las soluciones A y B se conservan a 4°C hasta su utilización.

- Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL

La solución D se conserva a -20°C hasta su utilización.

Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100  $\mu$ L) y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25

$\mu\text{L}$ ). Se añade agua bidestilada hasta 200  $\mu\text{L}$ . Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo se le añade 1 mL de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100  $\mu\text{L}$  de la solución C a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 25 ó 30 minutos.

Se mide la absorbancia de cada una de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por intrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queríamos conocer.

### **4.3 Determinación de malondialdehído.**

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de suero e hipocampo, se utiliza una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992) hecha por nuestro grupo de investigación (Romero et al., 1998), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA. Se ha utilizado un equipo de HPLC (Waters) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 binary HPLC Pump.
- Detector de fluorescencia Waters 2475 fluorescence.
- Inyector: Waters 717 plus Autosampler con loop de 50  $\mu\text{l}$ .
- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador IBM Windows.
- Software: Breeze.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil C18 5  $\mu\text{m}$  de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L.). El flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 sg.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos a 4°C durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza unos minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar se centrifuga durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,25; 0,5; 1 y 2  $\mu\text{M}$ ). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

#### **4.4 Determinación de glutatión.**

La concentración de GSH en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed (Reed et al., 1980). El método se basa en la



reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno) dando lugar a derivados N-DNP. Estos derivados son rápidamente separados por HPLC lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados.

Se ha trabajado con un equipo de HPLC de la marca Gilson que consta de los siguientes componentes:

- Bombas cromatográficas: HPLC PUMP 322.
- Detector: de ultravioleta-visible 156.
- Autoinyector: 234 con loop de 100  $\mu$ l.
- Software: Unipoint.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil Amino  $5\mu$ m de  $250 \times 4,6$  mm (Análisis Vínicos S.L). Las condiciones iniciales del flujo son de 1 ml/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales se mantienen durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0.005 y el tiempo de respuesta de 5 seg. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector con capacidad de 45 muestras.

La fase móvil A se prepara con metanol al 80% y la fase móvil B se prepara con acetato sódico 5M en metanol al 80%. Posteriormente se filtran ambas fases a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de  $0,45\mu$ m de poro y 47 mm de diámetro. La solución madre de calibración se prepara diariamente, dicha solución madre consiste en una concentración 10 mM de glutatión reducido en agua, una segunda solución madre se prepara con 10 mM de glutatión oxidado.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100mM y m-cresol 0.2 mM. La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno) 1.5% v/v etanol puro. Se prepara fresco cada día y se conserva a  $4^{\circ}$  C protegido de la luz.

En tubos eppendorf de 2 ml pipeteamos 0,2 ml de la muestra y 0.04 ml de ácido iodoacético 100 mM en 0.2 mM de m-cresol. Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO<sub>3</sub> 2,4 M en KOH 2M. Incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno para formar los derivados N-DNP los cuales requieren 4 horas en oscuridad a 4°C para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC.

En cada experimento se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 µM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

#### **4.5 Determinación de la actividad glutatión peroxidasa.**

La actividad glutatión peroxidasa (GPx) se determinó según el método propuesto por Lawrence (Lawrence et al., 1978) frente a peróxido de hidrógeno. Está basado en las siguientes reacciones:



La formación del glutatión disulfuro está catalizada por la actividad glutatión peroxidasa de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

Las soluciones que se emplean son las siguientes:

Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene:

EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM.

Solución B. Glutation Disulfuro reductasa 2.4 U/mL

Solución C. GSH 10 mM.

Solución D. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO<sub>3</sub> al 0.1%.

Solución E. Peróxido de hidrógeno 1.5 mM.

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 550 µL de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 50 µL de muestra.
3. 100 µL de la solución de glutacion reductasa (solución B).
4. 100 µL de la solución C.

Se preincuba esta muestra durante 5 min a 37 °C, tras lo cual se añaden 100 µL de la solución D. Se monitoriza durante 3 min el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos. Por último se añaden 100 µL de la solución E, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$C = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

V<sub>f</sub> = volumen final en mL

V<sub>m</sub> = volumen de muestra en mL

ε = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

$\Delta A$  = disminución de la absorbancia a 340 nm

$\Delta t$  = intervalo de tiempo considerado.

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

#### **4.6. Determinación de colesterol libre.**

Se determinaron los niveles de colesterol libre según el método de Duncan (Duncan et al., 1979). A 500 $\mu$ l de muestra se añaden 300 $\mu$ l de KOH 33% y 3 ml de etanol 96% y sin saponificar se añade 3 ml de hexano y 900 $\mu$ l de agua bidestilada. Todo esto se agita vigorosamente y se recoge 1ml de la fracción orgánica, que se deseca. Previo a la medición se restituye con isopropanol. En cada experimento se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 5; 10; 20; 40; 80 y 100  $\mu$ g). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de de colesterol en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

Se miden los niveles de colesterol con un HPLC modelo Gilson 322 y utilizando una columna de Waters Bondapak C18 (30cm x 4mm) siendo la fase móvil 2-propanol/acetonitrilo (1:1 v/v) a un caudal de 1ml/min.

#### **4.7. Determinación de la capacidad antioxidante.**

La capacidad antioxidante total se mide mediante un kit comercial de ELISA (Antioxidant Assay kit, Cayman Chemical Company). El método se basa en la habilidad de los antioxidantes de la muestra para inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a  $ABTS^+$  por la metmioglobina. La cantidad de  $ABTS^+$  producido puede ser estimado leyendo la absorbancia a 750nm i 405nm. Bajo las condiciones de la reacción, los antioxidantes de la muestra causan una supresión de la absorbancia a 740nm o 405nm proporcional a su concentración. La capacidad de los antioxidantes de la muestra para prevenir la oxidación de ABTS se compara con la del Trolox, un tocoferol hidrosoluble análogo, y es cuantificada en milimolar equivalentes de Trolox.

**Procedimiento:**

En primer lugar se reconstituyen los componentes del kit. Se diluyen 3 ml de la solución tampón 10X (5mM de fosfato potásico pH 7.4, 0.9% cloruro de sodio y glucosa 0,1%) con 27 ml de agua bidestilada ( $H_2O_{dd}$ ). Se reconstituye el cromógeno con 6ml de  $H_2O_{2dd}$ . A continuación se añade 600 $\mu$ l de la solución buffer 1X al vial de la metmioglobina. Adicionar 1ml de  $H_2O_{dd}$  al vial del Trolox. Este será empleado para realizar la curva patrón. Diluir 10 $\mu$ l de peróxido de hidrógeno 9,82 M con 990  $\mu$ l de  $H_2O_{2dd}$ , seguidamente pipetear 20  $\mu$ l y diluirlos en 3.98 ml de  $H_2O_{dd}$  para conseguir una solución de trabajo de 441 $\mu$ M.

Se prepara los patrones de Trolox P<sub>0</sub>, P<sub>30</sub>, P<sub>60</sub>, P<sub>90</sub>, P<sub>120</sub>, P<sub>150</sub>, P<sub>220</sub>, diluyendo el Trolox en la solución buffer.

A continuación se adiciona 10  $\mu$ l de metmioglobina, 150  $\mu$ l de cromógeno y 10  $\mu$ l de los patrones y de las muestras. Por último se añade 40  $\mu$ l de  $H_2O_2$  y se incuba en oscuridad y agitando durante 5 minutos. Pasado este tiempo se mide inmediatamente la absorbancia a 405 nm en el lector de placas, 2030 Multilabel reader VICTOR x3 (PerkinElmer).

**4.8 Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-Blot.**

Los hipocampos que se seleccionaban para el western blot eran homogeneizados con el tampón de lisis (1 % tritonX-100, 50mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) suplementado con 1mM de DTT, 10mM NaF, 1mM de  $Na_2VO_4$  y 1x del inhibidor de proteasas Complete mini (Roche). Cuando ya está totalmente homogeneizado se incuban durante 30 minutos a 4°C, ya por último se centrifugan durante 20 minutos a 13.000 rpm, quedándonos el sobrenadante.

Para el western blot de la liberación del contenido mitocondrial, se incuban las mitocondrias con y sin atractilósido 100 $\mu$ M durante una hora a 30°C. El atractilósido induce la salida del contenido del espacio intermembrana mitocondrial, ya que se une al translocador de adeninas (ANT) favoreciendo el aumento de la permeabilidad mitocondrial transitoria (MPT). Después de la incubación se añade KCl y se centrifuga durante 10 minutos a 10.000 rpm, se recoge el sobrenadante de

esta centrifugación. 25-30 µg de proteína de este sobrenadante se empleaban para la realización del western blot.

La metodología de Western-blot empleada se describe en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, 2003). Las proteínas se analizan por SDS-PAGE en geles del 7.5-12.5% de poliacrilamida, se cargan 40 µg de proteína total. Antes de realizar la carga, se añade a las muestras tampón de carga 5x (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β-mercapto-etanol) y se calientan a 95°C durante 5 min. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utiliza el sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realiza a 200V durante 60 min. La transferencia se hace a una membrana de PVDF (*Immobilon<sup>TM</sup>-P Transfer Membrane*, Millipore) durante 90 min a 100 V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad) y con un tampón compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina.

Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñen en una solución de rojo Ponceau S (Sigma) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavan con TBS (*Tris-Buffered Saline*) y se incuban en solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en TBS + 0.1% Tween-20, TBT) durante 1 hora a temperatura ambiente, y en agitación.

A continuación se procede a incubar las membranas con los anticuerpos primarios, durante 1 hora o durante toda la noche (según anticuerpos), y después se realizan 3 lavados con TBT durante 30 min para eliminar los restos de anticuerpo. Tras estos lavados las membranas se incuban durante 45 min con los correspondientes anticuerpos secundarios, y se vuelven a lavar 3 veces con TBT durante 30 min. Los anticuerpos empleados para la inmunodetección se especifican en la Tabla 1 y fueron preparados a las concentraciones que se indica en 3% BSA en TBT. Las incubaciones de las membranas con los anticuerpos y sus posteriores lavados se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit *ECL* (Amersham). Las membranas se cubrieron con film transparente y se expusieron a films X-OMAT (Kodak).

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo primario distinto, fueron tratadas con 200 mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron abundantemente con TBS.

Anticuerpos primarios (WB)	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
<b>CREB-1</b>	Santa-Cruz	sc-186	1:1000	Policlonal de conejo
<b>pCREB-1(ser 133)</b>	Santa-Cruz	sc-7978-R	1:200	Policlonal de conejo
<b>BDNF</b>	Santa-Cruz	sc-548	1:1000	Policlonal de conejo
<b>Citocromo C</b>	Pharmigen	556433	1:1000	Monoclonal de ratón
<b>Smac/DIABLO</b>	Calbiochem	567365	1:1000	Policlonal de conejo
<b>Actina</b>	Sigma	A-5060	1:1000	Policlonal de conejo

Anticuerpo secundario (WB)	Casa comercial	Referencia	Dilución
<b>anti Rabbit IgG-HRP (Fc)</b>	Santa-Cruz	sc-3837	1:5000
<b>anti-mouse</b>	Thermoscientific	31437	1:5000

Tabla 1: Lista de anticuerpos empleados en la realización de este trabajo.

## 5. Estudios inmunohistoquímicos.

Realización de los cortes:

Se cortan los cerebros de rata en criostato (Microm) coronalmente a 25  $\mu$ m. Todos los niveles rostro-caudales de hipocampo, se adhieren a un portaobjetos “superfrost”.

### 5.1 Inmunohistoquímica de BrdU.

La inmunohistoquímica realizada con BrdU se basa en el método descrito por Rakic (Rakic, 2002). La técnica consiste en utilizar el BrdU (5-Bromo-2'-deoxiuridine) como un análogo de la timidina. Se incorpora a las cadenas de ADN de las células durante la fase S de síntesis donde la célula está duplicando su genoma,

es por ello por lo que podemos considerar esta prueba como un marcador de la neurogénesis al realizarla en tejido nervioso.

**Procedimiento:**

Se lavan los cortes de cerebro en PBS 0,1M pH 7.2. A continuación se desenmascara, para hacer accesible el BrdU del ADN al anticuerpo primario, el proceso de desenmascaramiento se compone de los siguientes pasos:

- a)** Baño de PBS-Tritón + METANOL 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- b)** Calentar Citrato 10mM pH 8 hasta que hierva, se añade el porta con la muestra y se deja enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
- c)** Baño de HCl 2N durante 30 minutos a 37° C (en estufa).
- d)** Baño de Tampón Borato 0,1M pH 8,5 durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- e)** Lavar con PBS 0,01M

Posteriormente se bloquea la peroxidasa endógena en oscuridad, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incuba con el anticuerpo primario anti-bromodeoxyuridine (Invitrogen) junto con suero para bloquear durante toda la noche en oscuridad a 4°C. El anticuerpo primario se diluye en PBS-Tritón 0,3% a una concentración de 1:200-1:300.

En nuestro caso, el anticuerpo anti-BrdU está biotinilado, luego no necesitamos un anticuerpo secundario. Se lavan los cortes con PBS 0,01M y se incuban con ABC (complejo avidina-biotina-peroxidasa) para amplificar la señal, 1h a temperatura ambiente en agitación. Ese complejo se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo primario.

Se lavan los cortes con PBS 0,01M y por último se revelan con DAB finalmente se lavan los cortes con PBS 0,01M y posteriormente se deshidrata la muestra y se cubre.



## **5.2 Inmunohistoquímica de doblecortina.**

La doblecortina es una proteína que está presente en las neuronas recién formadas, durante los primeros 10 días, pasado este tiempo ya el marcador que expresan es el NeuN (Brown et al., 2003). Por este motivo la DCX es útil como marcador endógeno para el estudio de la neurogénesis adulta y la morfología de las neuronas recién formadas.

Se lavan los cortes de cerebro en PBS 0,1M pH 7.2 para limpiar los cortes. Se desenmascara con tampón citrato pH 8, para ello se calienta el tampón hasta hervor y se añade a los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Se lavan los cortes con PBS. Posteriormente se incuban con el anticuerpo primario anti-doblecourtin (Abcam) diluido 1:400 en PBS-Tritón 0,3% y NGS 20% durante toda la noche. Se lavan los cortes con PBS, y se incuban con el anticuerpo secundario biotinilado, anti-rabbit (ATOM) durante una hora. Transcurrido este tiempo se lavan los cortes con PBS 0,1M y se incuban con ABC (complejo avidina-biotina-peroxidasa) para amplificar la señal, durante 1 hora a temperatura ambiente. Ese complejo se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo secundario. Finalmente se lavan los cortes con PBS 0,1M y se revelan con DAB. Se lavan los cortes con PBS y posteriormente se deshidratan las muestras y se cubren.

## **6. Estudio estadístico.**

### **6.1 Estadística descriptiva.**

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos.

La medida de dispersión de los datos utilizada fue la desviación estándar de la muestra.

## 6.2 Pruebas estadísticas.

Para este trabajo hemos utilizado las siguientes pruebas estadísticas:

- ANOVA de un factor.

En este trabajo existe la necesidad de comparar más de dos poblaciones, surgiendo el inconveniente del elevado número de comparaciones a realizar. Para obviar esto, utilizamos el análisis de la varianza, que contrasta simultáneamente todos los casos. El ANOVA de un factor sirve por tanto para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica que define los grupos que deseamos comparar se la llama independiente o factor, mientras que a la variable cuantitativa en la que deseamos comparar los grupos se la denomina dependiente.

La hipótesis que se pone a prueba es que las medias poblacionales son iguales, si esto es así, significa que los grupos no difieren en la variable dependiente, y en consecuencia la variable dependiente es independiente del factor.

La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias, consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido entre las medias que se comparan. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F.

Si las poblaciones muestreadas son normales y sus varianzas iguales, el estadístico F se distribuye según el modelo de probabilidad F de Fisher- Snedecor.

La interpretación de este estadístico es la siguiente: si el nivel crítico asociado al estadístico es menor que 0,05 rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad.

En los casos en que se aplica este análisis y se descarta la hipótesis nula, hay que utilizar lo que se denomina un contraste post hoc a posteriori para averiguar qué medias en concreto difieren de qué otras.

En nuestro caso, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó mediante un contraste pot hoc de tipo DMS (diferencia mínima significativa) que está basado en la distribución t de Student.

- Análisis de varianza factorial.

Un ANOVA factorial permite evaluar el efecto individual y conjunto de dos o más factores sobre una variable dependiente cuantitativa. En un modelo de dos factores, como es nuestro caso, los efectos de interés son tres: los dos efectos principales (uno por cada factor) y el efecto de interacción entre ambos factores.

En un análisis de la varianza factorial existe una hipótesis nula por cada factor y por cada posible combinación de factores:

- La hipótesis nula referida a un factor afirma que las medias de las poblaciones definidas por los niveles del factor son iguales.
- La hipótesis referida al efecto de una interacción afirma que tal efecto es nulo.

Para contrastar estas hipótesis, el ANOVA factorial se sirve de estadísticos F basados en la lógica expuesta para el ANOVA de un solo factor. Así pues, para cada efecto existe una hipótesis y para cada hipótesis un estadístico F que permite contrastarla. El nivel crítico asociado a cada factor es el que nos permite decidir si podemos o no, rechazar una hipótesis.

Al igual que en el ANOVA de un factor, en este caso también se realizan contrastes post hoc para saber que medias difieren de cuáles. En nuestro caso se realizó el contraste DMS.

Para la realización del análisis estadístico se ha utilizado el programa de estadística “SPSS 15.0”.



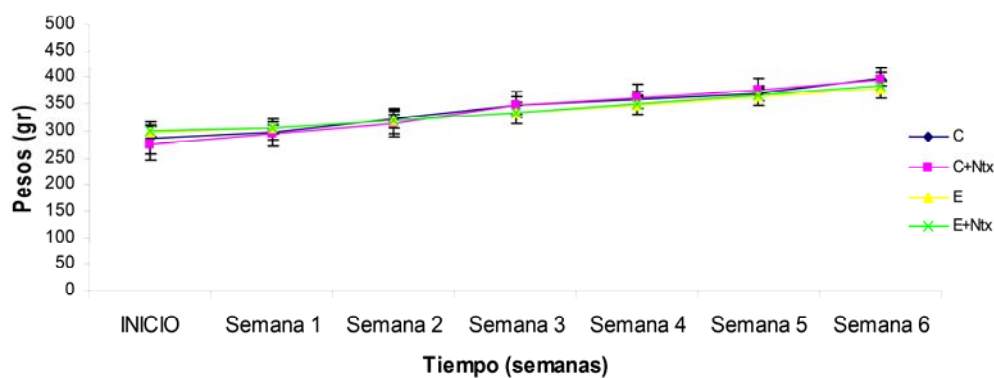
## **IV.- RESULTADOS**



## 1. Evolución del consumo de dieta y del peso de los animales de experimentación.

La cantidad media diaria ingerida por el grupo control fue de  $78 \pm 18$  ml, mientras que en el grupo etanol fue de  $80 \pm 15$ . La cantidad media ingerida por el grupo control-naltrexona fue de  $76,81 \pm 18,4$  ml y para el grupo etanol-naltrexona fue de  $78,07 \pm 12,0$ . No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el volumen medio de dieta ingerida por los diferentes grupos ( $p > 0,05$ ), lo que representa una ingesta calórica no significativamente diferente.

La evolución del peso medio de las ratas viene representada en la Figura 12. El peso medio inicial fue de  $284 \pm 26$  gramos en el grupo control, mientras que en el momento de sacrificio era de  $398 \pm 12$  gramos, siendo similar al resto de los grupos tal como viene expresado en la Tabla 2. No se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la evolución del peso entre los grupos en ninguna fase del experimento ( $p > 0,05$ ).



**Figura 12.** Evolución del peso medio de las ratas a lo largo de las 6 semanas de estudio, n=8 por grupo.

	Inicio experimento	Fin experimento
Control	284 ± 26	398 ± 12
Etanol	299 ± 7	384 ± 17
Control + Naltrexona	277 ± 36	394 ± 19
Etanol + Naltrexona	302 ± 6	383 ± 7

Tabla 2: Pesos medios (gr) al inicio y al final del experimento, n=8 por grupo.

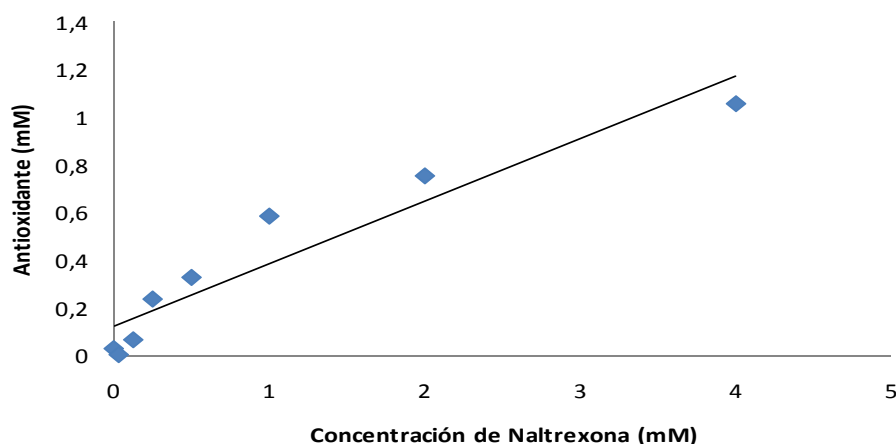
## 2. Niveles de alcoholemia.

Los niveles medios de etanol en las ratas alcohólicas a partir de la cuarta semana fueron de  $14,42 \pm 5,82$  mmol/l. Estos datos concuerdan con multitud de estudios anteriores que han utilizado este modelo y, que son clínicamente relevantes (Lieber et al., 1989).

## 3. Capacidad antioxidante de la naltrexona.

Como se explica en la introducción está descrito como la naltrexona actúa como antagonista de los receptores  $\mu$ -opioides, y de esta propiedad radica sus funciones farmacológicas como coadyuvante en los tratamientos de deshabituamiento del consumo de alcohol. Pero en la actualidad se está estudiando el efecto de la administración de la naltrexona en otras patologías, dándole en ciertos estudios carácter antioxidante. Por este motivo quisimos determinar la capacidad antioxidante de la naltrexona, midiendo la capacidad antioxidante total de diferentes disoluciones de concentraciones crecientes de naltrexona. Como se explica en el apartado de material y métodos el kit se basa en la capacidad de la muestra de inhibir la oxidación de ABTS, es decir a mayor concentración de ABTS<sup>+</sup> nos indica una menor capacidad antioxidante. Como se puede observar en la Figura 13, las disoluciones de mayor concentración de naltrexona presentan mayor capacidad antioxidante de forma estadísticamente significativa, ya que evitan en mayor medida la oxidación del ABTS.





**Figura 13.** Capacidad antioxidante total,  $r=0.9472$ .  $p<0,001$

#### **4. Estudio del suero.**

##### **4.1. Parámetros bioquímicos.**

Para estudiar si el consumo de etanol afecta al estrés oxidativo y si la naltrexona es capaz de revertir este efecto, medimos diferentes parámetros bioquímicos, defensas antioxidantes como el GSH o la actividad GPx, y productos de la peroxidación lipídica como el MDA. Un aumento de éstos últimos o una disminución de las defensas antioxidantes provocarían un aumento del estrés oxidativo, según la definición dada por Sies (Sies, 1985).

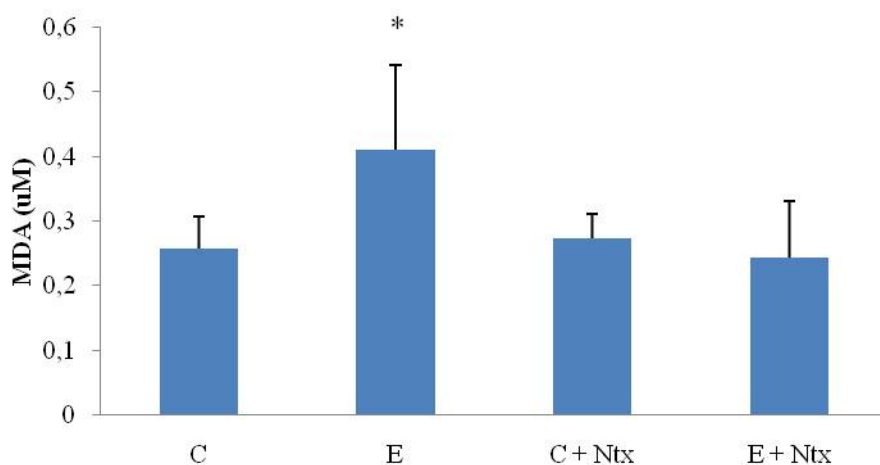
El estudio del estrés oxidativo lo realizamos en suero para tener un valor sistémico o general del estado redox del animal, y en hipocampo que es la zona del cerebro de interés como se describe previamente en la introducción.

Todos los resultados presentados en este trabajo están expresados como media  $\pm$  desviación estándar, las muestras son obtenidas el último día de los experimentos.

##### **4.1.1. Concentración de MDA en suero.**

Después de obtener el suero como se indica en el apartado de material y métodos, se determinaron diferentes parámetros bioquímicos entre ellos la concentración de MDA. Como se puede observar en la Tabla 3 y en la Figura 14 existe un aumento de la concentración de MDA en el suero de las ratas del grupo

etanol, siendo este aumento estadísticamente significativo respecto al grupo control, control+naltrexona y etanol+naltrexona, por lo que el tratamiento con naltrexona después de 6 semanas de consumo de etanol es capaz de revertir a niveles control la concentración de MDA sérico.



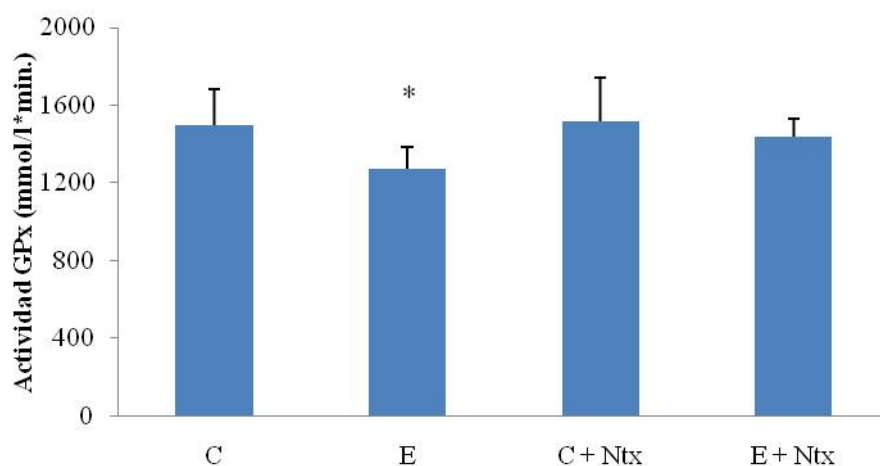
**Figura 14. Concentración de MDA en suero.** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.

#### 4.1.2. Actividad GPx en suero.

En la Tabla 4 se muestran junto a la concentración de MDA, los valores de la actividad GPx obtenida del suero de las ratas. En la Figura 15 se representa gráficamente como el consumo de etanol durante 6 semanas disminuye de forma significativa la actividad de la GPx respecto a los grupos control y control + naltrexona. En este caso la administración de naltrexona también recupera de forma significativa la actividad de la GPx.

	MDA	GPx
Control	0,26 ± 0,05	1495 ± 188
Etanol	0,41 ± 0,13 *	1270 ± 112 *
Control + Naltrexona	0,27 ± 0,04	1517 ± 226
Etanol + Naltrexona	0,24 ± 0,09	1375 ± 131

Tabla 4: **Parámetros bioquímicos en suero.** Concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ ) y actividad GPx ( $\text{mmol/l} \cdot \text{min.}$ ) \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.



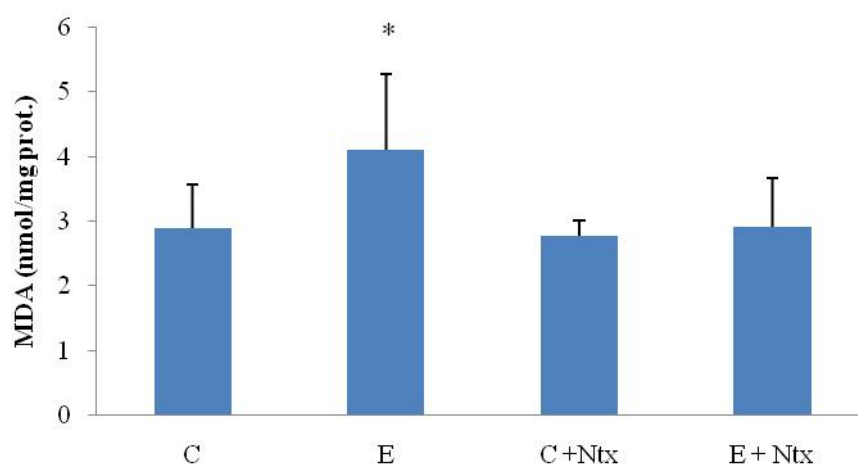
**Figura 15. Actividad GPx en suero.** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.

## 5. Estudio del hipocampo.

### 5.1. Parámetros bioquímicos.

#### 5.1.1. Concentración de MDA en hipocampo.

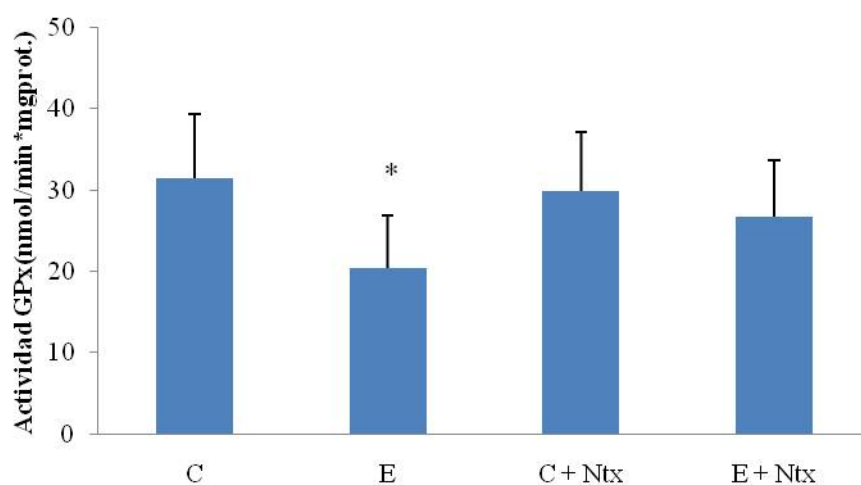
En la Tabla 5 y en la Figura 16 se presentan las concentraciones de MDA en el homogeneizado de hipocampo. Se puede observar como existe un aumento estadísticamente significativo de la concentración de MDA en el grupo etanol respecto a los grupos control, control + naltrexona, etanol + naltrexona. En el caso del hipocampo al igual que ocurría en el plasma, el tratamiento con naltrexona es capaz de revertir de forma significativa el aumento de la concentración de MDA en el grupo de animales que consumen etanol.



**Figura 16. Concentración de MDA en hipocampo.** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.  $n=8$  por grupo.

### 5.1.2. Actividad GPx en hipocampo.

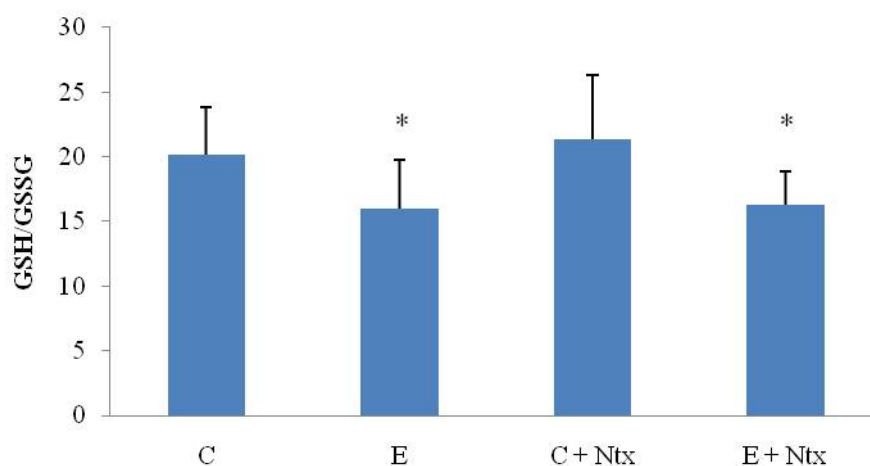
En la Figura 17 se representa la actividad GPx en el homogeneizado de hipocampo. Se observa como en el grupo etanol existe una disminución estadísticamente significativa de la actividad de esta enzima respecto a los grupos control y control naltrexona. El tratamiento con naltrexona en el grupo etanol no es capaz de recuperar de forma significativa la pérdida de actividad de la GPx.



**Figura 17. Actividad de GPx en hipocampo.** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo control y control naltrexona.  $n=8$ .

### 5.1.3. Ratio GSH/GSSG.

En la Figura 18 se representa gráficamente la relación entre la concentración de GSH y de GSSG en el homogeneizado de hipocampo. Se observa como en el grupo etanol y etanol + naltrexona existe una disminución de la ratio GSH/GSSG. Que haya una disminución de la ratio GSH/GSSG quiere decir que o bien existe un aumento de la forma oxidada del GSH, el GSSG, o una disminución del GSH. De cualquier modo una disminución de esta ratio nos indica una disminución de los agentes antioxidantes a favor de un aumento de los agentes oxidantes.



**Figura 18. Ratio GSH/GSSG en hipocampo.** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo control y control naltrexona.  $n=8$ .

	MDA	GPx	GSH/GSSG
Control	2,89 ± 0,68	31,49 ± 7,79	20,19 ± 3,6
Etanol	4,10 ± 1,17 *	20,45 ± 6,45 **	15,95 ± 3,8**
Control + Naltrexona	2,77 ± 0,23	29,85 ± 7,23	21,33 ± 4,9
Etanol + Naltrexona	2,91 ± 0,75	26,68 ± 7,01	16,29 ± 2,6**

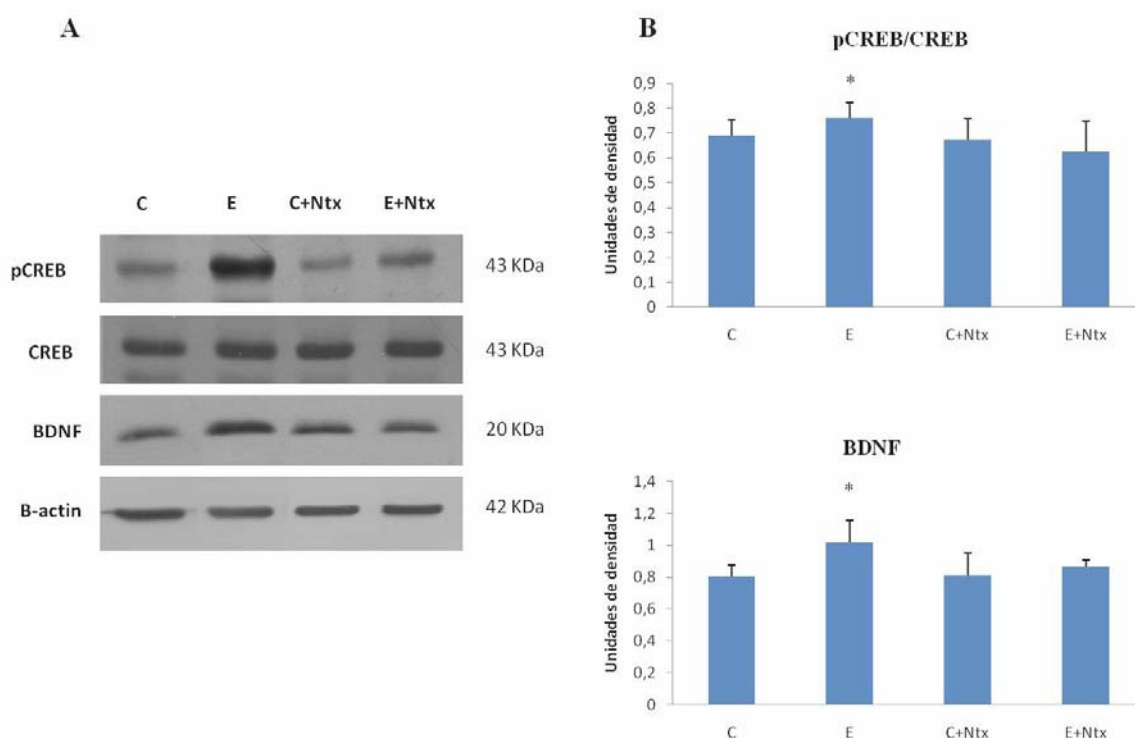
Tabla 4 **Parámetros bioquímicos en hipocampo.** Concentración de MDA (mmol/mg de proteína) \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos. Actividad GPx (nmol/mg de proteína x min.) y ratio GSH/GSSG \*\*  $p < 0,05$  respecto al grupo control y control naltrexona.  $n= 8$  por grupo.

## 5.2. Estudio de las proteínas pCREB/CREB y BDNF en hipocampo.

La determinación de CREB y su forma fosforilada pCREB, se realizó mediante la técnica de Western Blot como se describe en el apartado de Material y Métodos.

En la Figura 19 se observa como en el grupo etanol existe un aumento estadísticamente significativo de la fosforilación de CREB en hipocampo, que es la forma activa de esta proteína. La administración de la Naltrexona, que es un antagonista de los receptores  $\mu$ -opioides, es capaz de inhibir esta fosforilación. No existen cambios de CREB, al igual que describen otros autores (Pandey et al., 2003).

Al observar que existía un aumento de la fosforilación de CREB, quisimos estudiar BDNF, que es una de las proteínas diana de pCREB. Como se observa en la Figura 19, en el grupo etanol existe un aumento de BDNF, dicho aumento se correlaciona con el aumento de pCREB. En es este caso la naltrexona también inhibe el aumento de BDNF.



**Figura 19. a)** Western Blot de las proteínas pCREB, CREB y BDNF. Actina como control de carga. **b)** Gráficas de la cuantificación del western, Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.  $n = 8$  por grupo.

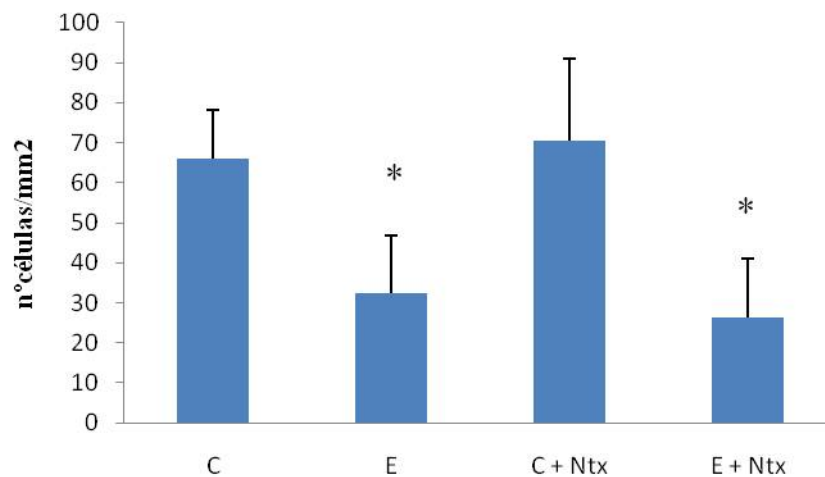
### 5.3. Estudio inmunohistoquímico.

#### 5.3.1. BrdU.

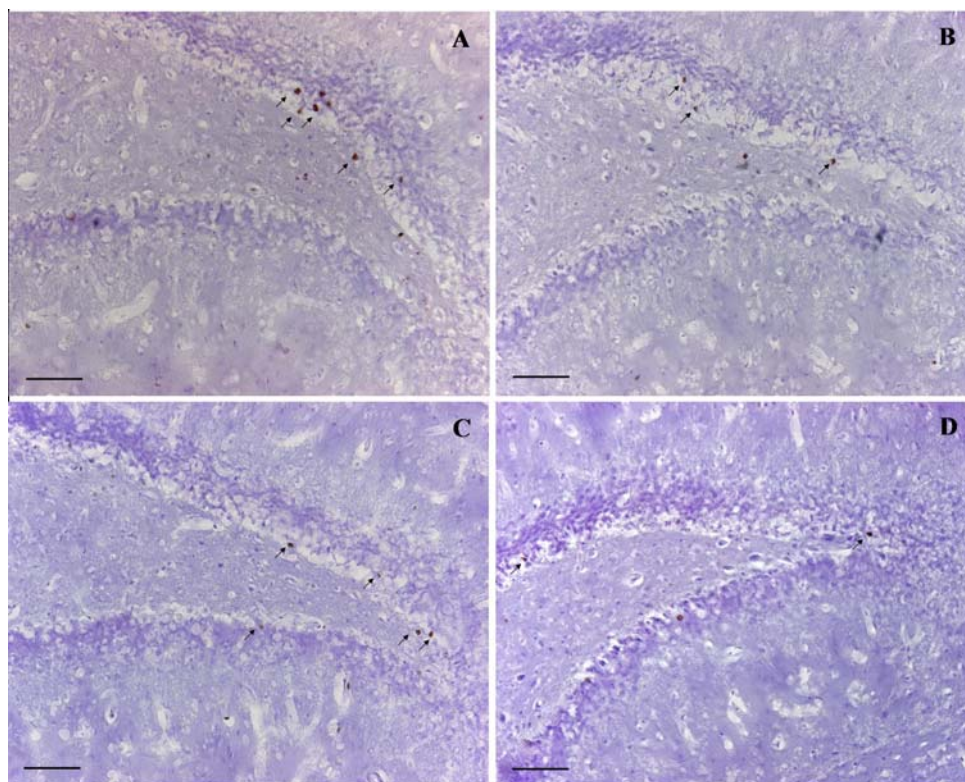
En el presente trabajo como se explica en material y métodos, pretendemos estudiar el efecto del etanol sobre la proliferación celular concretamente en la supervivencia y observar si la naltrexona interviene en mejorar dicho parámetro.

Se estudió la expresión de BrdU en el hipocampo de las ratas de todos los grupos al final del experimento y se observó una expresión basal localizada principalmente en el giro dentado.

Como se puede observar en la Figura 21 y en la Gráfica 20, después de 6 semanas de consumo de etanol en el grupo etanol existe una disminución significativa de la supervivencia celular, y en este caso la naltrexona no ejerce ningún papel protector de dicha supervivencia, ya que existe también una disminución significativa del número de células BrdU positivas en el grupo etanol + naltrexona frente al control y control + naltrexona.



**Figura 20. Expresión de BrdU (nº cel/mm<sup>2</sup>).** Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto al grupo control y control naltrexona.  $n=8$ .



**Figura 21.** Expresión de BrdU ( $n^{\circ}$  cel/mm<sup>2</sup>) en el hipocampo (20x), barra=50 $\mu$ . A). Control, B) Etanol, C) Control+ Naltrexona y D) Etanol+Naltrexona.

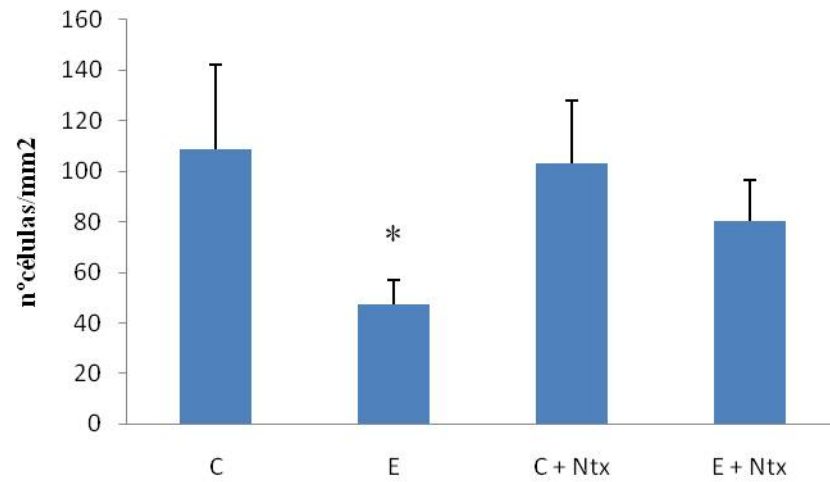
### 5.3.2. Doblecortina.

Con la inmunohistoquímica para Doblecortina pretendemos estudiar si existe proliferación de nuevas neuronas, y nuevamente estudiar si la naltrexona ejerce algún papel en la proliferación de las neuronas recién formadas.

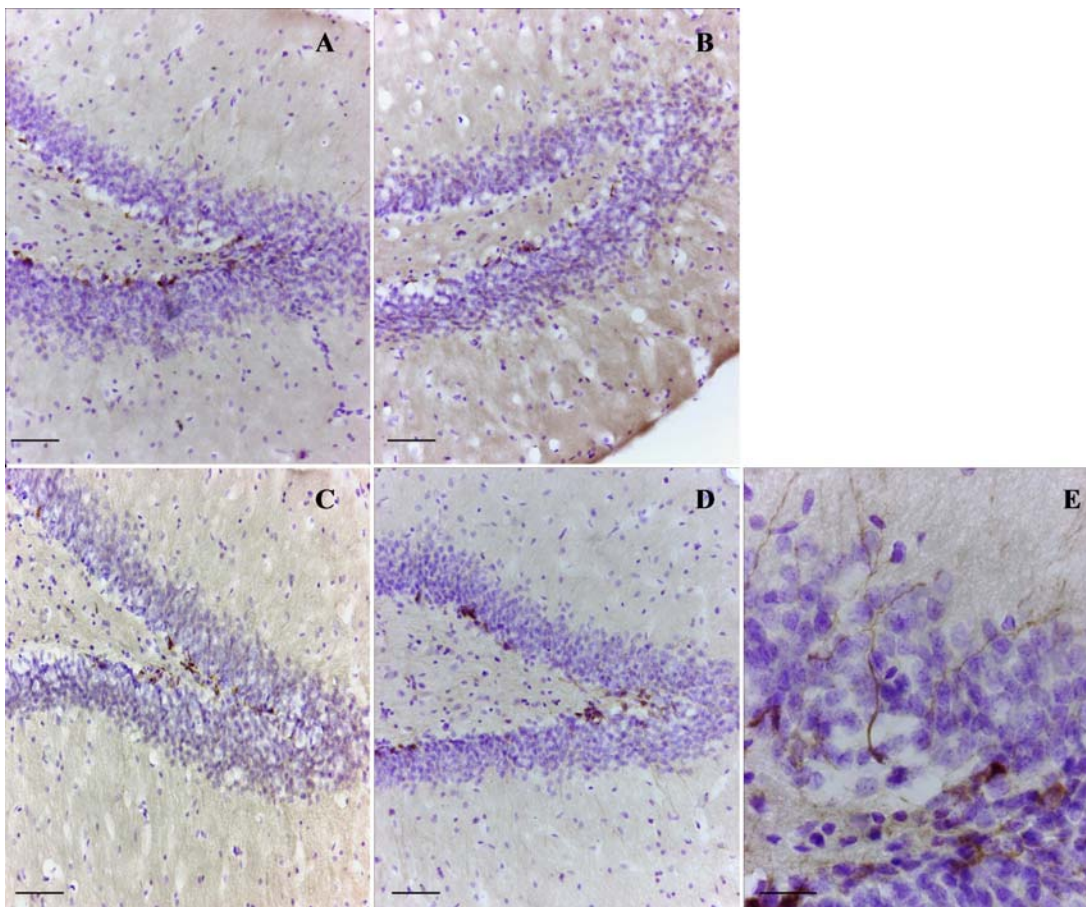
Las células marcadas con Doblecortina se observaban en la capa subgranular del giro dentado (Figura 22) y sus prolongaciones se extendían hacia el exterior, como se puede observar en el detalle de la Figura 23

El etanol produce una disminución en el número de nuevas neuronas que proliferan en el giro dentado como se puede observar en la Figura 22 y en la Figura 23, dicha disminución es significativa respecto a todos los grupos del estudio. Es decir en esta ocasión la naltrexona sí mejora la proliferación de las nuevas neuronas recién formadas.





**Figura 22.** Expresión de doblecortina (n° cel/mm<sup>2</sup>). Control (C), Etanol (E), Control + Naltrexona (C+Ntx) y Etanol + Naltrexona (E+Ntx). \*  $p < 0,05$  respecto a todos los grupos.  $n=8$ .

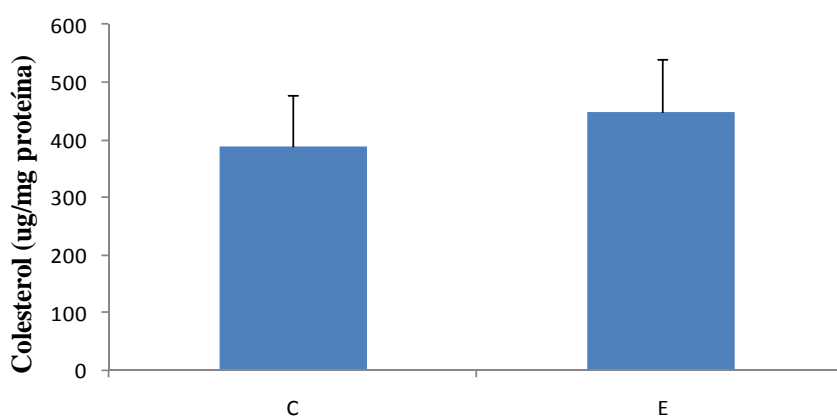


**Figura 23.** Expresión de la DCX (n° cel/mm<sup>2</sup>) en el hipocampo (20x), barra=50 $\mu$ . A). Contro, B) Etanol, C) Control+ Naltrexona y D) Etanol+Natrexona. E).Detalle del marcaje de la DCX, ampliación (60x) de la foto del grupo control. Barra =20  $\mu$ m.

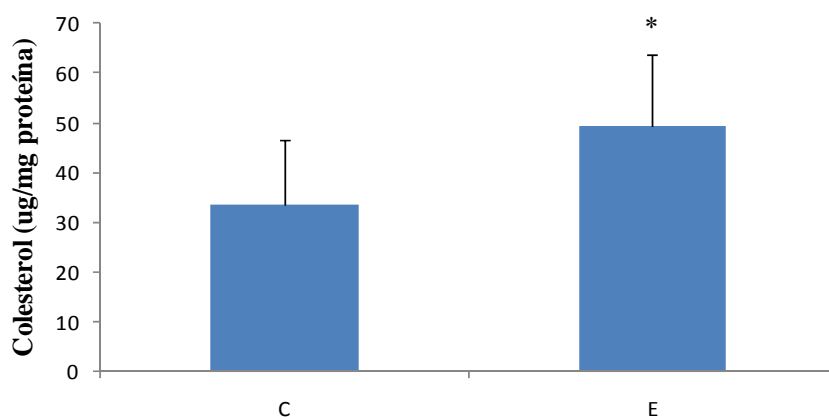
## 6. Estudio de los efectos del etanol sobre la mitocondria de cerebro.

### 6.1. Concentración de colesterol libre.

Se determinó la concentración de colesterol libre tanto en homogenado de cerebro como en la fracción mitocondrial de cerebro de rata en los grupos control y etanol. Como se puede observar en la Figura 24, no existe variaciones en la concentración de colesterol libre en el homogenado de cerebro entre el grupo control y etanol. En cambio a nivel mitocondrial sí existe un aumento estadísticamente significativo en el grupo etanol respecto al control (Figura 25).



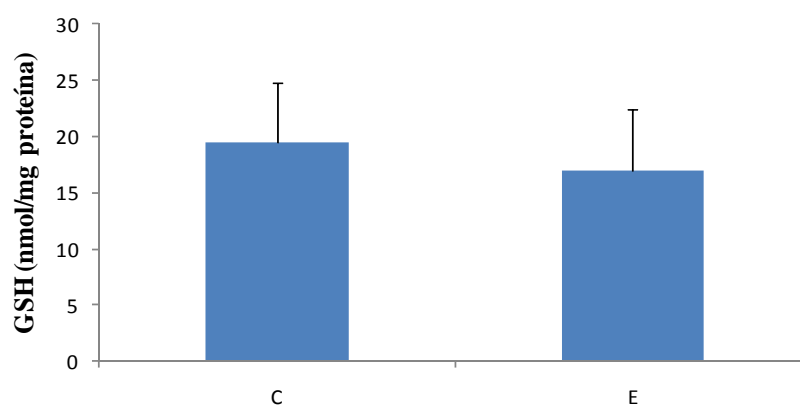
**Figura 24.** Concentración de colesterol en homogenado de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E).



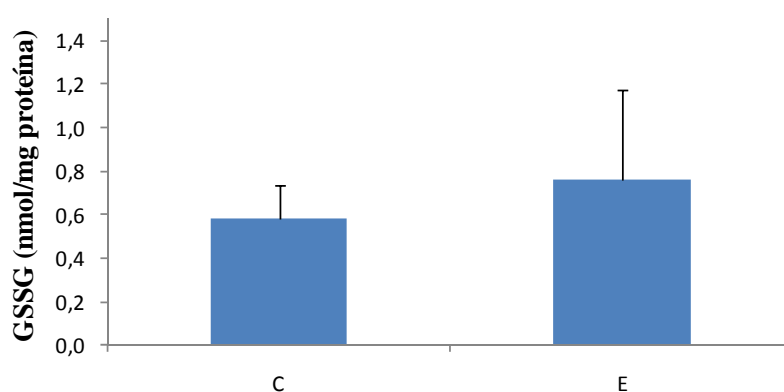
**Figura 25.** Concentración de colesterol en mitocondria de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E). \* $p < 0.05$  respecto al grupo control.

## 6.2. Concentración de glutatión.

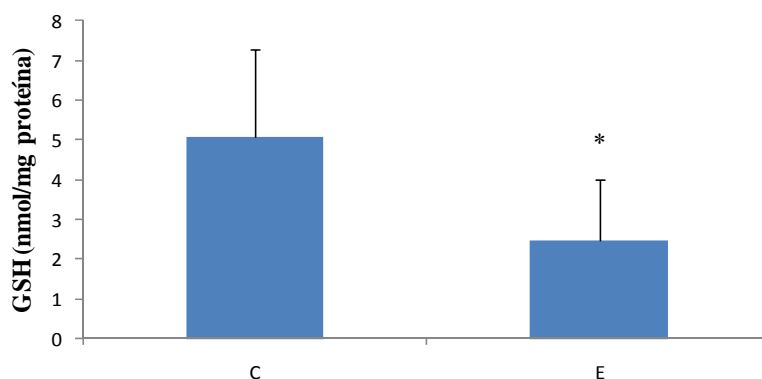
Como se puede observar en las Figuras 26 y 27, no existe modificación de la concentración de GSH ni tampoco de la concentración de GSSG en el homogenado de cerebro, en cambio cuando medimos el GSH mitocondrial observamos que en el grupo etanol existe una disminución significativa de la concentración de GSH, y esto se correlaciona con el aumento significativo de la concentración de GSSG mitocondrial (Figuras 28 y 29).



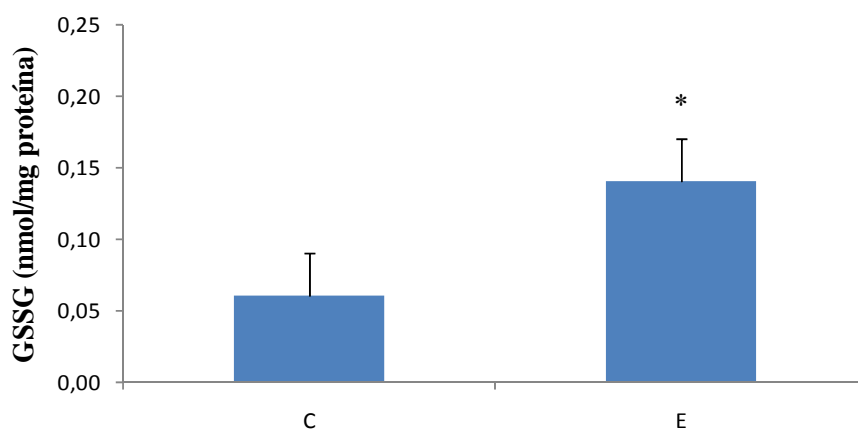
**Figura 26.** Concentración de GSH en homogenado de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E).



**Figura 27.** Concentración de GSSG en homogenado de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E).



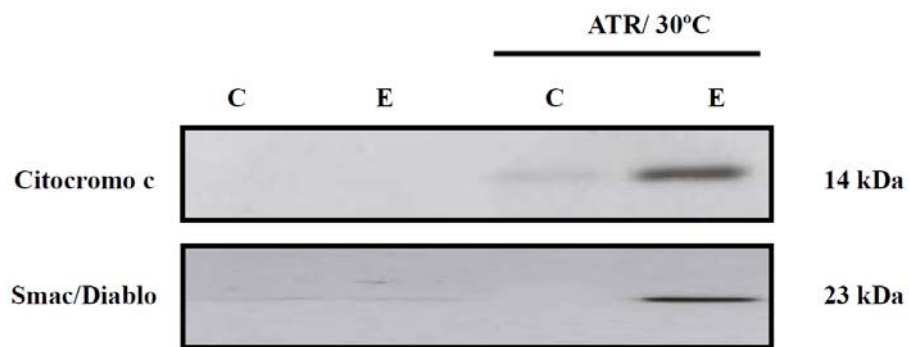
**Figura 28.** Concentración de GSH en mitocondria de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E). \* $p < 0.05$  respecto al grupo control.



**Figura 29.** Concentración de GSSG en mitocondria de cerebro, en los grupos Control (C) y Etanol (E). \* $p < 0.05$  respecto al grupo control.

### 6.3. Liberación de proteínas proapoptóticas.

En el western blot de la Figura 30 se puede observar que el etanol provoca la liberación tanto de citocromo C como de la proteína Smac/Diablo, cuando se expone a las mitocondrias a estímulos proapoptóticos tal y como se explica en el apartado de material y métodos.



**Figura 30.** Liberación de proteínas proapoptóticas de las mitocondrias Control (C) y Etanol (E) sin y con exposición a atractilósido (ATR).



## **V.- DISCUSIÓN**





## **1. Efecto de la administración crónica de etanol sobre el estrés oxidativo en el cerebro de rata.**

El etanol es un tóxico de consumo muy difundido en nuestro entorno, pudiendo ejercer la acción tóxica bien por su efecto directo mediante la generación de radicales libres o a través de sus metabolitos. Se ha relacionado a los radicales libres como uno de los principales factores implicados en las alteraciones derivadas de su consumo en forma crónica, tanto del sistema nervioso central: cerebro (Omodeo-Sale et al., 1997; Jindal & Gill, 1999), cerebelo (Rouach et al., 1997), como del periférico (Bosch-Morell et al., 1998).

Los radicales libres pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones en macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones) o los lípidos de membrana (provocando su peroxidación). Se ha demostrado experimentalmente que la ingesta crónica de etanol conduce a un aumento de los productos de la peroxidación lipídica y un descenso de factores antioxidantes como el glutatión (GSH) y enzimas derivados (Schlorff et al., 1999; Fernandez-Checa, 2003). Además, el consumo de alcohol ha sido relacionado con un daño mitocondrial, resultando en un descenso en la producción de ATP (Koch et al., 2004).

Diversos estudios (Tabuchi et al., 1995; Kono et al., 2001) han demostrado que el uso de antioxidantes puede prevenir los daños hepáticos y en la mucosa gástrica provocados por el alcohol. También en el sistema nervioso se han utilizado antioxidantes para reducir neuropatías inducidas por etanol (Bosch-Morell et al., 1998; Avino et al., 2002; Johnsen-Soriano et al., 2007a; Sancho-Tello et al., 2008).

En nuestro modelo experimental los animales fueron alimentados con una dieta equilibrada, asegurándonos que el aporte nutricional y calórico en todos los grupos fuese homogéneo. Podríamos afirmar que las deficiencias vitamínicas, a las que clásicamente se han atribuido un papel fundamental en la patología de la neuropatía asociada al alcoholismo, no han influido en nuestros resultados, o si lo han hecho, ha sido en la misma medida en todos los grupos. Un déficit nutricional en algún oligoelemento que forme parte de las enzimas antioxidantes como el Cu, Zn o Se, o de algún aminoácido necesario para la síntesis de GSH, como la metionina o la

cisteína, se manifestaría como un descenso en la concentración de GSH en todos los grupos, bien por el exceso de consumo del mismo por la acumulación de  $O_2^-$  ó  $H_2O_2$ , bien por la limitación en la síntesis.

En el presente estudio la demostración de que el consumo crónico de etanol provoca una producción elevada de los radicales libres y de los productos derivados de la peroxidación lipídica (MDA), así como el descenso de los niveles de antioxidantes endógenos (ratio GSH/GSSG) y actividad GPx, son evidencias que apoyan el papel del estrés oxidativo en el daño inducido por etanol sobre el hipocampo (Figuras 15, 16, 17 y Tabla 4 de Resultados). Estos resultados concuerdan con anteriores resultados que describen que el etanol administrado crónicamente induce cambios significativos en el hipocampo, cerebelo, la corteza y también en la retina donde el etanol reduce el contenido de GSH y aumenta la peroxidación lipídica (Calabrese et al., 2002; Sancho-Tello et al., 2008).

### **1.1 Efecto del consumo de alcohol sobre la mitocondrias cerebrales.**

Se sabe que en el consumo crónico de etanol existe una amplia variedad de daños funcionales sobre el cerebro, tanto visuales, como motores, y en la función de memoria y aprendizaje. El etanol ejerce estos efectos por su interacción con el sistema de neurotransmisores, membranas celulares y receptores, modificando las funciones claves sobre el SNC (Herrera et al., 2003; Johnsen-Soriano et al., 2007a; Sancho-Tello et al., 2008). Aunque los mecanismos moleculares y celulares que provocan estos efectos no están completamente identificados, muchos estudios han observado que uno de los mecanismos farmacológicos que median los efectos del etanol dan por resultado un aumento de estrés oxidativo (Sun et al., 2001). Este estrés oxidativo se ha demostrado que produce un significativo descenso en las enzimas antioxidantes y altera la homeostasis en el cerebro acompañado por un importante daño en las funciones dependientes de hipocampo (Johnsen-Soriano et al., 2007a). En el presente trabajo como ya se ha comentado en apartados anteriores y coincidiendo con la literatura hemos observado que existe un descenso de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en los hipocampos de ratas que han consumido etanol de forma crónica comparado con los que han consumido dieta

control, al igual que un descenso de la ratio GSH/GSSG, acompañado a su vez de un aumento del MDA (Figuras 15, 16 y 17 de Resultados).

Estudiando el cerebro, existen grupos que han descrito un descenso en la concentración de GSH en diferentes áreas del cerebro de ratas que han consumido alcohol (Calabrese et al., 2002; Agar et al., 2003), en cambio en el presente trabajo nosotros encontramos que 6 semanas de consumo de etanol produce un ligero descenso de la concentración de GSH en el homogenizado de cerebro completo, y no existen cambios en la concentración de GSSG. Las discrepancias de nuestros resultados con los estudios de Calabrese et al., se podrían explicar por la elevada diferencia en la sensibilidad al etanol dentro de cada población específica de neuronas, lo cual podría atribuirse a las variaciones celulares observadas en la homeostasis del GSH (Maffi et al., 2008).

Que el GSH mitocondrial esté significativamente reducido en el cerebro de los animales que han consumido etanol (Figuras 27), podría ser un fenómeno relevante en el cual el GSH mitocondrial jugaría un papel crucial en la viabilidad celular como ya se describió en hepatocitos (Romero & Sies, 1984; Romero et al., 1984).

Colell et al., describieron como en las mitocondrias del hígado de ratas que han consumido etanol, existía una gran cantidad de colesterol, lo cual provoca un defecto en el transporte del GSH mitocondrial, debido al efecto del aumento de la microviscosidad de la membrana sobre las propiedades cinéticas del transporte de GSH. Esto se traduce en una disminución de la concentración de GSH mitocondrial (Colell et al., 1997). Dado que el cerebro es un órgano que tiene un alto contenido en colesterol, en nuestro estudio hemos cuantificado tanto el colesterol en el homogeneizado de cerebro completo como en la fracción mitocondrial, detectando un incremento del depósito de colesterol en las mitocondrias del cerebro de las ratas que han consumido etanol (Figura 24). En cambio no se observaron diferencias en la concentración de colesterol en el homogenado de cerebro completo entre los grupos control y etanol.

Otros estudios han mostrado que el enriquecimiento en colesterol de las membranas mitocondriales de hepatocitos de rata, deteriora al translocador de nucleótidos adenílicos (ANT) que media en el poro de transición de permeabilidad

mitocondrial (MPTP), con la subsiguiente liberación de proteínas proapoptóticas debido al descenso de la fluidez de la membrana mitocondrial (Colell et al., 2003). MPTP es un complejo multiproteico involucrado en los mecanismos de regulación de la muerte celular, y puede estar influenciado por diferentes factores incluyendo especies reactivas de oxígeno (Costantini et al., 2000; Vieira et al., 2001).

En el presente trabajo se observa que en las mitocondrias de cerebro de ratas control no se produce una liberación de proteínas proapoptóticas (SMAC/Diablo y Citocromo c), incluso tratándolas con atractilósido, de forma contraria a lo que se observa en hígado (Colell et al., 2003). Esto se podría explicar por la diferencia de contenido de colesterol de ambos tejidos y consecuentemente el contenido de colesterol mitocondrial.

Los niveles de GSSG están aumentados en la fracción mitocondrial de cerebro de rata alcohólica, confirmando la carga oxidativa inducida por el consumo de etanol. En estudios preliminares no se han observado diferencias en la formación de productos de peroxidación lipídica en mitocondrias aisladas de cerebro de rata, después de la incubación con etanol y con acetaldehído respectivamente, en concordancia con Haorah et al., los cuales describen una nueva ruta de neurodegeneración asociada al abuso de alcohol (Haorah et al., 2005; Haorah et al., 2008). Estos autores describen que en neuronas humanas están activas ambas enzimas que metabolizan el alcohol: la alcohol deshidrogenasa y la CYP2E1.

Para comprobar si las mitocondrias del cerebro de rata del grupo etanol son más susceptibles a los estímulos proapoptóticos, como el atractilósido, se estudió, a través de la técnica de *western blot*, la liberación de proteínas apoptóticas, SMAC/Diablo y de Citocromo c. Y se observó que el atractilósido provoca la liberación tanto de Citocromo c como de SMAC/Diablo de las mitocondrias del grupo tratado con etanol. Estos resultados concuerdan con otros estudios que describen que la exposición al etanol en neuronas fetales con bajo contenido en GSH induce la liberación de marcadores apoptóticos (Ramachandran et al., 2003b; Maffi et al., 2008), y que el etanol aumenta la apoptosis en neuronas que están experimentando muerte celular provocada por otros factores (Krzyzanski et al., 2007).

## **1.2. Naltrexona en el tratamiento del alcoholismo. ¿Propiedades antioxidantes?**

La administración de etanol induce la liberación de opioides endógenos, tanto en animales de laboratorio (Marinelli et al., 2003; Marinelli et al., 2005) como en humanos (Dai et al., 2002). En cambio, la administración de antagonistas opioides como la naltrexona, se ha observado que disminuye los efectos subjetivos positivos y el comportamiento asociado al consumo de etanol. Por ejemplo en pacientes alcohol dependientes se ha visto que la naltrexona disminuye el consumo de etanol (Anton et al., 2004; Feinn & Kranzler, 2005). Estudios en diferentes laboratorios han concluido que la naltrexona en bebedores sociales, puede disminuir el efecto subjetivo estimulante del alcohol y el impulso a beber (Peterson et al., 2006; Setiawan et al., 2011), es por todo ello que la naltrexona junto con abordaje psicoterapéutico es uno de los fármacos de elección para la deshabitación del consumo de alcohol.

En la actualidad se están buscando diferentes usos a la naltrexona. Diversos estudios sugieren que los opioides endógenos modulan el estrés oxidativo en diferentes tejidos y pueden afectar a la supervivencia y proliferación celular (Payabvash et al., 2007). En un estudio experimental de colestasis crónica observaron que, con la administración crónica de naltrexona, se mejoraba de forma significativa los niveles de GSH en hígado de rata. Además esta recuperación de la concentración de GSH era de forma dosis dependiente (Payabvash et al., 2007), los autores en este trabajo describen que la naltrexona ejerce su efecto protector por el bloqueo de los receptores opioides. En otro trabajo del mismo grupo inhiben la apoptosis inducida por la morfina tanto con la administración de naltrexona como con la de N-acetil-cisteina (Payabvash et al., 2006), y proponen que la reducción del estrés oxidativo en hígado es presumiblemente el motivo por el que se reduce la apoptosis de los hepatocitos.

Los péptidos opioides están reconocidos como moduladores de la liberación de ROS en diferentes tipos de células inflamatorias (Sobocanec et al., 2006). La administración de naloxona inhibe la liberación del anión superóxido en neutrófilos humanos de forma dosis-dependiente (Simpkins et al., 1985). Además, la naltrexona confiere un efecto anti-inflamatorio a través del bloqueo de los receptores opioides.

Se ha observado que la naltrexona reduce de forma significativa la infiltración de neutrófilos en hígado y disminuye los niveles de TNF- $\alpha$  en un modelo de inflamación inducida por LPS (Lin et al., 2005).

Existen trabajos donde pretratamientos con naltrexona reducen de forma significativa el fallo circulatorio y la disfunción hepática en sepsis inducida por LPS, estos efectos están asociados con la reducción de los altos niveles de TNF- $\alpha$ , y la disminución de la formación de anión superóxido (Lin et al., 2005). En el estudio de Lin et al., administran la naltrexona antes de inducir el daño por LPS, a modo de prevención. En nuestro trabajo administramos la naltrexona como tratamiento, después de 4 semanas de consumo de etanol, y observamos como la naltrexona es capaz de normalizar la concentración de MDA tanto sérico como en el hipocampo, además el grupo etanol-naltrexona recupera los valores séricos normales de la actividad de la enzima GPx. Wang et al., observó que la administración de naltrexona 30 minutos después de tratar a las ratas con LPS era capaz de reducir las concentraciones en plasma de ALT y AST, enzimas indicativas de daño hepático, al cabo de 12 horas del tratamiento con LPS (Wang et al., 2008). A su vez en este mismo trabajo se obtuvo una reducción de la formación de anión superóxido en hígado en el grupo de ratas a las que se había administrado la naltrexona.

Por otro lado, Agrawal propone que la naltrexona administrada a bajas dosis (3-4.5 mg/día) podría ayudar al tratamiento de la esclerosis múltiple (Agrawal, 2005). Su hipótesis se basa en que en la esclerosis múltiple los peroxinitritos producidos por astrocitos y microglia inhiben los transportadores de glutamato en la hendidura sináptica provocando una neurotoxicidad excitatoria por el glutamato, por lo que postula que la naltrexona a bajas dosis actúa reduciendo la actividad de la oxido nítrico sintasa. Esto produce una reducción en la formación de peroxinitritos, lo cual previene la inhibición de los transportadores de glutamato. En nuestro trabajo observamos que el etanol provoca un aumento de la producción de MDA, un producto de la peroxidación lipídica, y que con la administración de naltrexona disminuye la concentración de MDA hasta valores control, tanto en hipocampo como en suero. Se sabe que el consumo crónico de etanol incrementa la expresión de la oxido nítrico sintasa neuronal (nNOS), lo cual podría modificar la cantidad de NO producido por las diferentes áreas del cerebro (Chalendler et al., 1997) por lo que

siguiendo la hipótesis de Agrawal, se podría explicar la reducción de MDA que observamos en el grupo etanol+naltrexona, ya que la naltrexona podría estar reduciendo la actividad de la oxido nítrico sintasa, reduciendo de este modo la producción de NO, previniendo la posible generación de peroxinitritos, responsables entre otros de la peroxidación lipídica (Radi et al., 1991).

A partir de este posible mecanismo, se determinó si la naltrexona tenía o no capacidad antioxidante, usando la técnica de la oxidación de ABTS a ABTS<sup>+</sup> por la metmioglobina. Los resultados muestran que esta oxidación disminuye conforme aumentamos la concentración de naltrexona (Figura 12 de Resultados).

Los radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones en macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el DNA (provocando mutaciones) o los lípidos de membrana (provocando su peroxidación). Se ha demostrado experimentalmente que la ingesta crónica de etanol conduce a un aumento de los productos de la peroxidación lipídica y un descenso de factores antioxidantes como el GSH y enzimas derivados (Schlorff et al., 1999; Fernandez-Checa, 2003). Además el consumo de alcohol ha sido relacionado con daño en las mitocondrias, resultando en un descenso en la producción de ATP (Koch et al., 2004).

En el presente trabajo se observa como la administración de naltrexona como tratamiento después de 4 semanas de consumo reduce la situación de estrés oxidativo ya que disminuye la peroxidación lipídica y existe una tendencia de recuperación de los valores de la actividad de GPx en hipocampo. Por todo ello se podría pensar que la naltrexona aparte de ser utilizada en los tratamientos de deshabitación por sus propiedades como antagonistas opioide, tiene otro efecto beneficioso ya que podría ejercer su acción antioxidante, y mejorar la situación de estrés oxidativo que tiene lugar en el alcoholismo crónico.

## **2. El etanol modula la expresión de pCREB y de BDNF.**

Las drogas de abuso pueden ejercer su profundo efecto a largo plazo en el sistema nervioso central por la modulación de rutas de señalización que controlan la expresión génica. Un destacable punto en la expresión de los genes es la regulación

de la transcripción. Un importante factor de transcripción es la proteína de unión en respuesta al AMPc (CREB). CREB ayuda a modular la plasticidad sináptica, y se sabe que esto juega un importante papel en los mecanismos que subyacen al aprendizaje y memoria.

CREB representa un punto de convergencia en la acción de diferentes neurotransmisores y/o moduladores en varios neurocircuitos del cerebro, incluido el hipocampo, amígdala, estriado ventral, (NAc). La ruta de señalización del AMPc es una de las mayores dianas sobre la que actúa el etanol y otras drogas de abuso en el SNC.

Se sabe que CREB no se distribuye de la misma manera en las diferentes áreas de cerebro. De forma basal su expresión está aumentada de forma significativa en el NAc respecto a la expresión de CREB en el ATV, no habiendo diferencias en el hipocampo y corteza (Walters et al., 2003). A su vez en la literatura existen discrepancias sobre el efecto de la administración de etanol sobre la expresión de CREB y pCREB. Estas diferencias pueden ser debidas en la mayoría de las ocasiones a la diferente metodología empleada en los distintos estudios; la especie animal, si el consumo es crónico o agudo, la forma de administrar la droga y según el área del cerebro que se estudia.

Hoffman y Tabakoff observan un aumento de actividad en hipocampo y corteza después del tratamiento agudo (Hoffman&Tabakoff, 1990) en cambio Bison y Crews observaron como la administración aguda de etanol producía una disminución de pCREB en estas mismas áreas y que únicamente tras la abstinencia durante 72 horas observaban un aumento en la fosforilación de CREB (Bison&Crews, 2003).

Pandey et al., determinaron que el consumo crónico de etanol durante 15 días de dieta alcohólica no afectaba a la activación de CREB, pero que tras 24 horas de abstinencia existía una disminución de pCREB en la amígdala central y medial (Pandey et al., 2003). En el presente trabajo la administración del etanol es mucho más prolongada (6 semanas), además 24 horas antes del sacrificio de la rata, se retira el etanol, es decir se induce una abstinencia 24 horas antes de la finalización del experimento. En estas condiciones se observa como en el hipocampo del grupo etanol existe un aumento de forma significativa de la expresión de pCREB del



mismo modo que Pandey observó este aumento de pCREB en el cíngulo tras 24 horas de abstinencia, habiendo únicamente una disminución de la expresión de pCREB en el grupo etanol sin abstinencia.

Recientemente se ha postulado que el factor de transcripción CREB funciona como intersección entre la recompensa del consumo de la droga y la respuesta al estrés. La ruta CREB/pCREB está afectada por el efecto del etanol, tanto en el consumo agudo como crónico. Del mismo modo, situaciones de estrés y la subsiguiente activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal está asociado con un incremento de pCREB en diferentes áreas del cerebro después de diferentes situaciones de estrés como el choque eléctrico, sucesivas inmovilizaciones, y la prueba de la natación forzada (Stanciu et al., 2001; Bilang-Bleuel et al., 2002). Además Kreibich et al., ha demostrado que repetidas exposiciones a la prueba de natación forzada antes del primer día de la administración de cocaína, potencia el condicionamiento de preferencia de lugar para la droga (Kreibich et al., 2009). Este modelo tiene importantes implicaciones clínicas, ya que se propone al estrés como el factor crítico que subyace a la vulnerabilidad frente a las drogas de abuso (Kreibich et al., 2009). A su vez este grupo demostró que la función de CREB era necesaria para que la situación de estrés aumentara la recompensa a la cocaína ya que en ratones mutantes para CREB no tenía lugar la preferencia de lugar. Observaron un aumento de pCREB en diversas zonas del cerebro después de una serie de natación forzada. Las regiones del cerebro donde se veía este incremento de pCREB son áreas muy relacionadas con el circuito cerebral de la adicción, como son NAc, amígdala, septum lateral.

En este trabajo se observa como en el grupo etanol, el cual ha tenido 24 horas de abstinencia, existe un aumento de la fosforilación de CREB. Tal vez dicho aumento sea parte de la respuesta a una situación de estrés.

Un gran número de estudios clínicos muestran que el antagonista opioide naltrexona es un coadyuvante farmacológico muy efectivo para reducir la recaída en alcohólicos (O'Malley et al., 1992; Volpicelli et al., 1992; O'Malley, 1995). Existen múltiples evidencias que demuestran que el estímulo de recompensa por el etanol aumenta la actividad del sistema opioide endógeno (Gianoulakis & de Waele, 1994; Gianoulakis, 1996; Herz, 1997), por lo que se ha hipotetizado que la recompensa por

el etanol está mediada, al menos en parte, por un incremento de la actividad opioide (Koob, 1992; Self & Nestler, 1995).

Esta descrito que en muchas ocasiones después de la administración de forma crónica de la droga, la abstinencia podría ocasionar una situación de desequilibrio. En cambio en el grupo etanol+naltrexona, no se observa dicho aumento de pCREB. Es posible que la naltrexona como antagonista opioide bloquee los receptores opioides y evite que se active el estímulo de la recompensa, inhibiendo de este modo el estrés ocasionado por la búsqueda de la droga.

Se ha relacionado un desajuste en la regulación de BDNF con el desarrollo de enfermedades psiquiátricas, incluyendo esquizofrenia, depresión, ansiedad y adicción al alcohol (Angelucci et al., 2005; Davis, 2008).

Al igual que ocurría con la expresión y la activación de CREB, en la literatura existen multitud de discrepancias a la hora de analizar BDNF y su relación con el consumo de diferentes drogas de abuso. Existen trabajos que han observado que en ratas el tratamiento crónico con etanol provoca una disminución de la expresión de BDNF en el hipocampo y corteza (MacLennan et al., 1995; Pandey et al., 1999). Por el contrario, mientras que McGough et al. describen que la expresión de BDNF está aumentada en el estriado dorsal de ratón después de consumo agudo y autoadministración de alcohol (McGough et al., 2004). Además, ellos han observado que una disminución de los niveles de BDNF lleva a un incremento del consumo de etanol mientras que el incremento de BDNF atenúa los efectos del consumo en ratones. Estos resultados sugieren que la ruta de señalización de BDNF puede servir como ruta homeostática envuelta en la regulación de la adicción al alcohol (McGough et al., 2004).

Por otro lado, BDNF interviene en la ruta dopaminérgica mesocorticolímbica originada en el ATV y NAc también conocida como ruta de la recompensa. Estudios recientes implican a las neurotrofinas como mediadores en los procesos de recompensa y de adicción a las drogas. Por ejemplo, drogas psicoactivas como cocaína, anfetaminas o alcohol, administradas tanto a través de inyección o por autoadministración, incrementan la expresión de RNAm de BDNF y los niveles de esta proteína en los núcleos paraventriculares del hipotálamo y en diferentes áreas mesolímbicas, corteza cingulada y estriado. (Fumagalli et al., 2007; Logrip et al.,

2009). En cambio los niveles de BDNF en corteza se ven reducidos tras largos periodos de autoadministración de etanol (Logrip et al., 2009). Además, la inyección o sobreexpresión de BDNF en el ATV incrementa el consumo (Graham et al., 2007) y la respuesta a las drogas psicoestimulantes, que se acompaña de un aumento del condicionamiento de la preferencia de lugar (Bahi et al., 2008).

También se piensa que el incremento de los niveles de BDNF facilita la transición desde la respuesta aguda de recompensa hacia un estado de dependencia, característico de la adicción. Además, la inyección o sobreexpresión de BDNF dentro de la ruta de recompensa, sensibiliza la respuesta dopaminérgica a las drogas (Vargas-Perez et al., 2009) y facilita el comportamiento de búsqueda de la droga (Lu et al., 2004) y recaída (Graham et al., 2007). Otros autores por el contrario la inyección en la corteza prefrontal medial de BDNF disminuye búsqueda de cocaína (Berglind et al., 2007). Se sabe que la regulación dinámica de la síntesis y liberación de BDNF en NAc durante el consumo de cocaína contribuye al desarrollo y mantenimiento de la adicción a cocaína (Graham et al., 2007). Todo esto indica que el desarrollo de la adicción a las drogas está en parte mediado por alteraciones en la señalización de BDNF.

Pardon et al., observó un aumento en los niveles de proteína de BDNF en el hipocampo después de 1 hora de exposición a un nuevo ambiente (Pardon et al., 2005). Además, el estrés por inmovilización induce un rápido incremento de los niveles de BDNF y de los niveles de proteína en el hipotálamo y en hipocampo de rata, pero este efecto se observa hasta una hora después de la aparición del estrés, después se transforma en una disminución de los niveles de BDNF tanto de su RNAm como de proteína cuando la duración de la experiencia adversa incrementa (Marmigere et al., 2003). Esto sugiere que la inducción de BDNF es parte de la respuesta normal a una situación de estrés, posiblemente para prevenir resultados perjudiciales. Además no debemos olvidar que BDNF es un factor neurotrófico regulado por la activación de CREB, por lo que si una situación de estrés promueve la fosforilación de CREB, es fácil suponer que habrá un aumento de BDNF, que es la situación que se observa en el presente estudio, donde el grupo etanol tiene un aumento de BDNF en hipocampo (Figura 18).

Por ello es de especial interés que con la administración de naltrexona se inhiba el aumento tanto de pCREB como de BDNF. Se sabe que la naltrexona ejerce parte de su acción disminuyendo los circuitos que activan el refuerzo asociado al consumo de la droga, disminuyendo de esta forma su consumo, por lo que podríamos pensar que tanto pCREB y BDNF están implicados en dichos circuitos.

### **3. Efecto del consumo de alcohol sobre la neurogénesis.**

La neurogénesis, considerada como un proceso del desarrollo, que implica la proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de células madre del sistema nervioso central en neuronas (Palmer et al., 1997), se puede ver afectada por numerosos factores. Algunos de estos factores incluyen a hormonas, los neurotransmisores, el daño cerebral e incluso un ambiente enriquecido puede inducir la neurogénesis del hipocampo. Dados estos antecedentes parece claro que el estudio de la neurogénesis en el hipocampo puede tener capital importancia en nuestro modelo de alcoholismo.

En la actualidad el hecho de que el etanol afecta a la neurogénesis está completamente demostrado, existen multitud de estudios donde se han estudiado el efecto del etanol sobre la neurogénesis en hipocampo: estudios sobre el síndrome alcohólico fetal (Crews & Nixon, 2003), en ratas adolescentes (Crews et al., 2006; Morris et al., 2010), en adulto después de consumo agudo y consumo crónico (Herrera et al., 2003; Richardson et al., 2009) ect. Este trabajo muestra como la administración de etanol durante 6 semanas reduce la neurogénesis, habiendo un descenso de la supervivencia celular en el grupo etanol respecto al control, corroborando los estudios anteriormente mencionados.

La disminución del número de células recién nacidas en el giro dentado de ratas expuestas al alcohol podría ser debida a una alteración de la proliferación de las células madre del hipocampo, a una disminución de la supervivencia o a ambas. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación observaron que el consumo de etanol afectaba a la supervivencia y no a la proliferación en el giro dentado de hipocampo, ya que las ratas del grupo control y del grupo etanol presentaban el

mismo número de células positivas a BrdU en el giro dentado una hora después de la última inyección de BrdU, hecho que afirma que la proliferación celular no se ve afectada. Sin embargo, después de 2 semanas las células positivas a BrdU disminuyeron hasta los niveles observados a las 6 semanas después de la exposición al etanol (Herrera et al., 2003), por lo que la supervivencia de las nuevas células sí se ve afectada por el consumo de etanol. Además, el giro dentado de los animales expuestos a etanol mostró un aumento marcado de muerte celular, principalmente en las capas más basales del giro dentado, donde se localizan la mayor parte de las células recién nacidas. La cuantificación mediante las técnicas de Nissl y TUNEL condujo a los mismos resultados. Estos hechos sugieren que la exposición a etanol afectó a la supervivencia sobre todo en las dos primeras semanas, y que la proliferación no estaba afectada (Herrera et al., 2003). Todo esto podría explicar el hecho que en el presente trabajo se observe que la administración de la naltrexona no mejore la supervivencia celular en giro dentado de hipocampo, ya que el BrdU se inyecta durante los primeros 10 días de administración de la dieta alcohólica, y la naltrexona se administra 4 semanas después, por lo que según lo observado por Herrera et al., en este intervalo de tiempo el número de células BrdU<sup>+</sup> ha disminuido un 70%, respecto al control. Por lo que en futuros trabajos se debería administrar la naltrexona antes de producirse este descenso en la supervivencia para de este modo poder determinar si la naltrexona tiene algún papel protector en la supervivencia celular.

La doblecortina está expresada a lo largo de toda la zona subgranular con las dendritas extendiéndose fuera de la capa molecular. El marcaje con doblecortina puede validar el efecto inhibitorio sobre la neurogénesis observado con el marcaje de BrdU, al tratarse de un marcador endógeno de las neuronas recién formadas.

En el presente trabajo se observa como en las ratas del grupo alcohol existe una disminución de células DCX<sup>+</sup> respecto al grupo control, He et al., también observaron que la dieta líquida alcohólica reduce el número de células DCX<sup>+</sup> después de 2 y 4 semanas de consumo (He et al., 2005). La elaboración de los procesos dendríticos está relacionada con la madurez de los neuroblastos. DCX se puede observar en los procesos de ramificación extendiéndose dentro de la capa molecular del giro dentado. Cuatro semanas de exposición al etanol disminuyen en

un 50% el número de nódulos y terminaciones en las dendritas. También se reduce la longitud de las dendritas apicales si se compara con el grupo control. Estos datos sugieren a este grupo que el consumo crónico de etanol disminuye el crecimiento de las dendritas de las neuronas recién formadas, provocando un déficit en la maduración en giro dentado del hipocampo (He et al., 2005).

El alcohol reduce la formación de nuevas neuronas, aunque las células que sobreviven al tratamiento de alcohol continúan su diferenciación mayoritariamente en neuronas, y la *ratio* de diferenciación es similar en el grupo control. Por lo que aunque la diferenciación no esté afectada por el consumo de alcohol, la neurogénesis sí se ve disminuida.

Uno de los aspectos más novedosos del presente trabajo sería la capacidad de la naltrexona de proteger del efecto lesivo de la administración crónica de etanol durante cuatro semanas a las células recién formadas en el giro dentado de la rata, y destinadas a ser neuronas, en un modelo terapéutico de administración.

## **VI.- CONCLUSIONES**





1. El modelo animal de consumo crónico de etanol con dieta líquida induce estrés oxidativo en el cerebro de rata (medido por las variaciones en MDA, Gpx y GSH), así como modificaciones en otras rutas de señalización (CREB, pCREB y BDNF).
2. El consumo crónico de etanol provoca una disminución del GSH mitocondrial a la vez que aumenta los niveles de colesterol en la mitocondria de cerebro, y ello podría ser el motivo por el que las mitocondrias cerebrales de los animales que han consumido etanol son más susceptibles a estímulos proapoptóticos.
3. El consumo crónico de etanol disminuye la neurogénesis en el hipocampo de rata, afectando a la supervivencia de las neuronas recién formadas.
4. La naltrexona administrada con carácter terapéutico (después de 4 semanas de consumo crónico y durante las 2 siguientes semanas junto con el alcohol) restablece los parámetros bioquímicos mencionados excepto la razón GSH/GSSG en el hipocampo de rata.
5. El tratamiento con la naltrexona restablece el número de células marcadas con doblecortina en este modelo de alcoholismo crónico, indicando que la naltrexona podría tener efecto protector sobre las neuronas recién formadas.



**PhD THESIS**  
**(Extended summary in**  
**English)**

**“Effect of chronic ethanol  
consumption on rat brain.  
Naltrexone treatment”.**

**Presented by: Inmaculada Almansa**  
**Supervised by: Prof. Dr. Francisco Javier Romero &**  
**Prof. Dr. Jorge Miguel Barcia**



## **I. INTRODUCTION**

### **1. Alcoholism.**

The consumption of alcoholic beverages is a widespread habit and culturally accepted in most part of the Western societies. In our country, the consumption of beverages such as wine or beer is a socially, culturally and gastronomically consolidated habit. However, consumption of alcoholic beverages in Spain and the problems associated with them are very important. Spain is one of the first producers and also one of the top consumers of alcoholic beverages (DGPNSD, 2010).

Alcohol is the most widely used drug in Spain, according to recent data collected by the Government Delegation for the National Drugs Plan (DGPNSD). While the consumption in the general population is declining, the proportion of binge drinking among young people is increasing. In 2009/10, 78.7% of the Spanish population between 15 and 64 years consumed alcohol "in the last year", 63.3% did so "in the last month" and 11% consumed it "every day." (DGPNSD, 2010).

Dependence and alcohol abuse are the most abundant mental illness in America, where approximately 14% of the population meets chronic alcoholic criteria during some period of his life (Lejoyeux et al., 2000). In addition, alcohol is involved in almost 50% of traffic accidents and the majority of homicides, suicides and cases of domestic violence: chronic intake being a major cause of death.

Over the past 30 years, scientists have turned their attention to the problem of alcohol to discover their pathophysiological basis, treatment and prevention (Room et al., 2005).

### **2. Neuropathology of alcohol.**

Although the neurobiology of psychoactive drugs has been described in great detail, much less is known about alcohol. Reinforcing effects of alcohol seem to be caused by an interaction with several neurotransmitters including primarily gamma-aminobutyric acid (GABA) and the opioid system, but it also affects dopamine (DA), glutamate and serotonin (Koob & Nestler, 1997).

The reason for the limited information in the case of alcohol is that its mechanism of action is nonspecific; it can have effects on a wide variety of

neurotransmitter systems. It seems that alcohol acts not only enhancing the inhibitory activity of GABA A receptors, but also by reducing the excitatory activity of subtype N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptor. Alcohol increases inhibition and reduces excitation and may explain its description as a "depressant" of neuronal functioning in the central nervous system (CNS). These effects of alcohol may explain some of its toxic, amnesic and ataxic effects. However, theoretically the reinforcing properties of alcohol are mediated by the effects on GABA and glutamate over the release of dopamine in the mesolimbic system (Figure 1). Alcohol also appears to release both opiates and cannabinoids in the reward system. Blocking cannabinoid receptors in animals reduces the craving for alcohol in dependent animals. The blockade of opiate receptors in human alcoholics with naltrexone decreases craving and, consequently, increases abstinence rates. If you drink while taking naltrexone, opioids released do not produce pleasure.

Molecular mechanisms have been proposed involving NMDA receptors which are upregulated by ethanol administration; in this case the neurons have greater sensitivity to the cytotoxic response induced by glutamate. Under this alteration of NMDA receptors, alcohol can also damage neurons by impairment of mitochondrial respiratory chain, generating further oxidative stress. Other mechanisms involve glutamate, the toxicity of the amino acid homocysteine with a free sulfhydryl group, although this action may be due to deficiencies in folate, and nutritional anemia present in many alcoholic patients (Harper & Matsumoto, 2005).

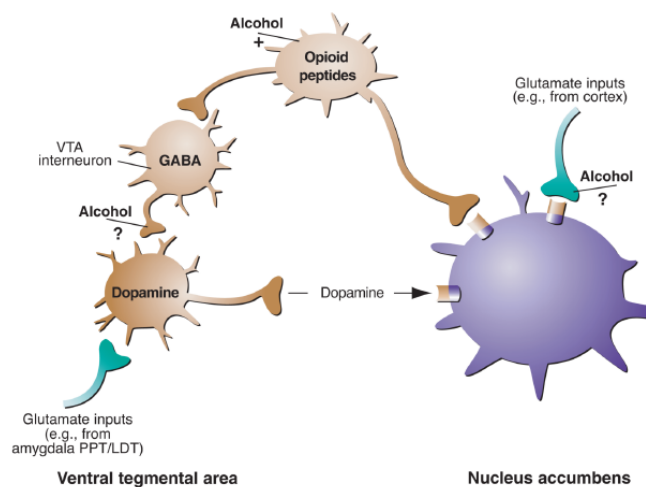


Figure 1. Acción del alcohol sobre el cerebro

Neurological toxicity associated with ethanol comprises several clinical and pathological entities, namely Wernicke encephalopathy, Korsakoff amnesic syndrome, alcoholic dementia, cerebral atrophy, alcoholic neuropathy, alcoholic myopathy, cerebellar degeneration, alcoholic nutritional amblyopia, central pontine myelinolysis, Marchiafava-Bignami disease and fetal alcoholic syndrome. All these diseases affect predominantly, if not exclusively, ethanol-dependent subjects, i.e. chronic alcoholics drinkers (Diamond, 1992).

### **2.1 Alterations induced by alcohol on the hippocampus.**

It is documented that chronic alcohol consumption causes cognitive impairment in alcoholic patients (Harper & Matsumoto, 2005). Some studies have suggested that cognitive impairment may affect the patient's recovery process and the implementation of treatment strategies (Bates et al., 2002).

Hippocampus has been identified as one of the most sensitive brain region to the effects of alcohol. The cognitive functions involved in this area, such as short-term memory and spatial memory, are particularly vulnerable to the effects of alcohol (Ryabinin, 1998). Neuroimaging studies have shown a significant reduction in hippocampal volume in alcoholic patients (De Bellis et al., 2000; Geuze et al., 2005). In animal models of alcoholism there is a decrease in the thickness of the dentate gyrus of the hippocampus that is due to a loss of neurons (Walker et al., 1980).

### **3. Opioid system.**

The endogenous opioid system has various physiological functions including pain regulation (inhibition of response to pain), modulation of gastrointestinal, endocrine and autonomic function, learning and memory.

Opioid receptors have a major role in brain circuitry of reward and addiction, they represent a common neurobiological substrate mediating the reinforcing property of most drugs of abuse and physical dependence. Opioids release dopamine in the Nac, a common phenomenon to all drugs of abuse, mainly through inhibition of GABA interneurons in the ventral tegmental area (TVA) (Gutstein & Akil, 2001; Flórez, 2003).

Opioid receptors are coupled to G proteins (Gai /  $\alpha_o$ ). After stimulation of an opioid receptor inhibition of adenylyl cyclase activity is produced, reducing the concentration of cAMP and the activity of cAMP-dependent protein kinase or PKA, resulting in decrease of protein phosphorylation. It also facilitates the closure of calcium channels in presynaptic neurons, thus reducing the neurotransmitter release and the opening of potassium channels (GIRK) of postsynaptic neurons, causing membrane hyperpolarization as resulting in reduced activation. Therefore they are receptors that mediate inhibitory actions (Gutstein & Akil, 2001; Flórez, 2003).

### **3.1. Alcohol and opioid receptors.**

The opioid system is one of the most important in controlling alcohol consumption (O'Malley, 1996; Herz, 1997). It has been suggested that alcohol may cause the release of certain opioid peptides (Jamensky & Gianoulakis, 1997; Koob et al., 1998) and that the increased activity of the brain due to enkephalin or  $\beta$ -endorphin levels in basal conditions and in response to alcohol may be important for the initiation and maintenance of high drug consumption (Gianoulakis et al., 1997; Froehlich et al., 2000). It has also been reported that the increase density of  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors in brain has an important role in positively reinforcing the effects of drugs of abuse (Marinelli et al., 2000).

$\beta$ -endorphin in the ATV acts by inhibiting the activity of GABAergic neurons, which in turn, reduces the inhibitory action that produces GABA in normal situations on dopaminergic neurons, thus increasing dopamine release in the terminals that project to both the prefrontal cortex and Nac (mesolimbic-cortical pathway) (Di Chiara & Imperato, 1988). It is known that a variety of drugs of abuse with different cellular mechanisms act on the mesolimbic-cortical pathway (Juárez, 2004).

Considering that alcohol triggers the release of endogenous opioids such as  $\beta$ -endorphin (Gianoulakis, 1990; Gianoulakis et al., 1996), and several structures related to enforcement mechanisms, such as NAc, with opioid receptors, part of the rewarding effect of alcohol may be mediated by a direct action of  $\beta$ -endorphin on these structures, in addition to its facilitating action on the release of dopamine from the TVA. Moreover, it has been postulated that low levels of  $\beta$ -endorphin may be a direct result of chronic alcohol consumption (Gianoulakis et al., 1996) and that this deficiency of  $\beta$ -endorphin during the abstinence period may contribute to the generation of anxiety and



alcohol search, because a negative correlation between  $\beta$ -endorphin levels and anxiety has been found during this period (Kiefer et al., 2002).

The contents of opioids, their biosynthesis and release are altered by chronic alcohol consumption, although in the literature there is disagreement about the direction of the changes. It has been reported that ethanol produces both, an increase, a decrease or even an absence of changes in the opioid system activity. These discrepancies in the literature may be due to methodological differences of the different studies such as ethanol administration, the amount and duration of consumption, as well as different species used (Kalant, 1985; Gianoulakis, 1993; Tabakoff & Hoffman, 1996).

In the abstinent period there is a great increase in cAMP. This large increase in cAMP increases the excitability of neurons and is the molecular basis of withdrawal signs and symptoms. This phenomenon has been demonstrated in locus *coeruleus*, Nac and ATV. It seems that the cause of the upregulation of the cAMP system is the increased production of a transcription factor called CREB (cAMP response element binding protein). In addition, CREB increases the synthesis of dynorphin, a substance that activates kappa receptors in the ATV neurons, resulting in a decreased release of dopamine in the NAc. This reduction contributes to negative emotional states (dysphoria and anhedonia) quite typical of abstinence (Bailey & Connor, 2005).

### **3.2 Naltrexone.**

One of the aims of drug therapy for alcoholism is to avoid or reduce alcohol consumption and relapse. Different substances have been used, including opioid antagonists which, based on the affinity for its receptors, may be nonspecific (naloxone, naltrexone) or specific (nalmefene,  $\beta$ -funaltrexamina, clocinnamox, naltrindole, naltriben, norbinaltorfimina). The use of these substances is based on their property of opioid receptor blocking, thereby reducing the reinforcing properties of alcohol. Opioid antagonists most studied and used in clinic are nonspecific, which are known to have a significant effect on consumption of alcohol (Coonfield et al., 2002), the rate of relapse and craving for alcohol in alcoholic patients .

Naltrexone (Figure 2) is derived from naloxone, an opioid antagonist without agonist properties. The activity of naltrexone is due both to the drug and its metabolite 6- $\beta$ -naltrexol, with a half of life of  $2.7 \pm 1.0$  h (Gonzalez & Brogden, 1988). Naltrexone affects the desire to drink that appears before and after alcohol intake.

Alcohol promotes an increase in opioid activity, which causes an increase in dopaminergic activity in the NAc. This, in turn, is based on the ability of alcohol to produce reinforcement and instantly causes an increased desire to continue consuming that patients perceive as a loss of control after the first drinks. By blocking opioid receptors, in alcohol consumption lose their initial enabling capacity and also after a first drink the patient does not lose control and does not fall into consumption.

Treatments must also include a psychotherapeutic approach, integrated and individualized for each patient, different studies to date agree that naltrexone is effective and blocks the uncontrolled consumption and progression to relapse in patients who started alcohol intake during treatment cessation (O'Malley, 1996).

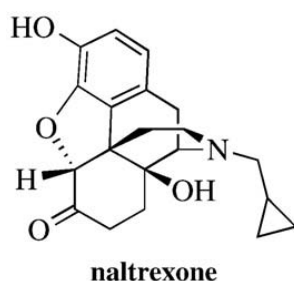


Figure 2: Naltrexone structure.

### **Mechanism of action of Naltrexone.**

Naltrexone blocks opioid ligand binding to its receptor thus it reduces the reinforcing properties of alcohol, therefore reducing their consumption (Gardell et al., 1996; Parkes & Sinclair, 2000; Pettinati et al., 2006). It has been reported that the attenuation of the reinforcing properties of ethanol may be related to opioid antagonists by inhibiting the action of endogenous endorphins on the NAc (Weiss & Porrino, 2002) and the blockade of opioid action on neurons that modulate dopaminergic activity in the TVA (Weiss et al., 1993; Weiss & Porrino, 2002; Lee et al., 2005). At the same time it has been observed that naltrexone has an anti-inflammatory and immunomodulatory effect *in vitro* and *in vivo* (Ray et al., 1992; Greenelch et al., 2004; Lin et al., 2005).

Different mechanisms have been postulated to explain the anti-inflammatory action of naltrexone:

- Naltrexone may induce unknown mediators whose function would be to inhibit TNF- $\alpha$ , production by the macrophages.

- Naltrexone induces the production of inflammatory cytokines as interleukins 10, 4 and 3 (IL-10, IL-4 and IL-3), which would decrease the production of TNF- $\alpha$  (Dinarello, 1997).

Nitric oxide can combine with superoxide anion to form peroxynitrite anion, the most powerful reactive nitrogen species, which decomposes to form hydroxyl radicals (Beckman et al., 1990). Both peroxynitrite anion and hydroxyl radicals are responsible for the initiation of cellular lipid peroxidation, protein oxidation and damage to mitochondrial function, which can cause tissue damage and induce cell death (Kukreja & Hess, 1992; Kukreja & Janin, 1997). Studies have shown that naltrexone reduces the polymorphonuclear cells infiltration in the liver, which indirectly could have caused oxidative damage, suggesting that some of the beneficial effects of naltrexone depend on its antioxidant properties (Wang et al., 2008).

But actually it is not yet known with certainty whether naltrexone has antioxidant properties by itself, or whether it is through a secondary mechanism.

#### **4. cAMP response element binding (CREB).**

cAMP response element binding (CREB) is a transcription factor that is bound as a dimer to cAMP response element (CRE), a specific DNA sequence. The CRE site is located within a regulatory region (promoter or enhancer) of many genes, if a promoter contains CREs, then it may be subject to regulation by CREB, depending on many factors specific to the tissue, including the formation of the nearby chromatin. Traditionally it was thought that CREB dimers were bound to CRE site at baseline, but now it is known to be inactive. According to this view, events in the neuronal membrane stimulate intracellular signaling cascade, causing phosphorylation of both members of the CREB dimer and result in its transcriptional activity (Mayr & Montminy, 2001). CREB is activated by phosphorylation of serine 133 by protein kinase A-dependent c-AMP (PKA), transforming it into p-CREB (Figure 3).

CREB protein is expressed in all cells of the brain, and it is a member of the family of proteins that act as a transcription factor. It is located inside the nucleus, transcription factors like CREB are crucial for linking transcription stimuli: transmission of events occurring in the cell membrane to changes in gene expression.

For this reason, the alteration of gene expression of this protein, by regulating the expression of virtually all types of neuronal proteins, may affect the function of individual neurons and neural circuits (Carlezon et al., 2005).

Numerous intracellular signaling pathways (Figure 3) are involved in transmitting information from the membrane receptor that mediates its action to the nucleus where they interact with CREB to trigger processes that culminate in gene transcription. The effectors of signaling pathways induce adenylyl cyclase (AC), cAMP, Ca<sup>2+</sup> and MAPK (mitogen activated protein kinase).

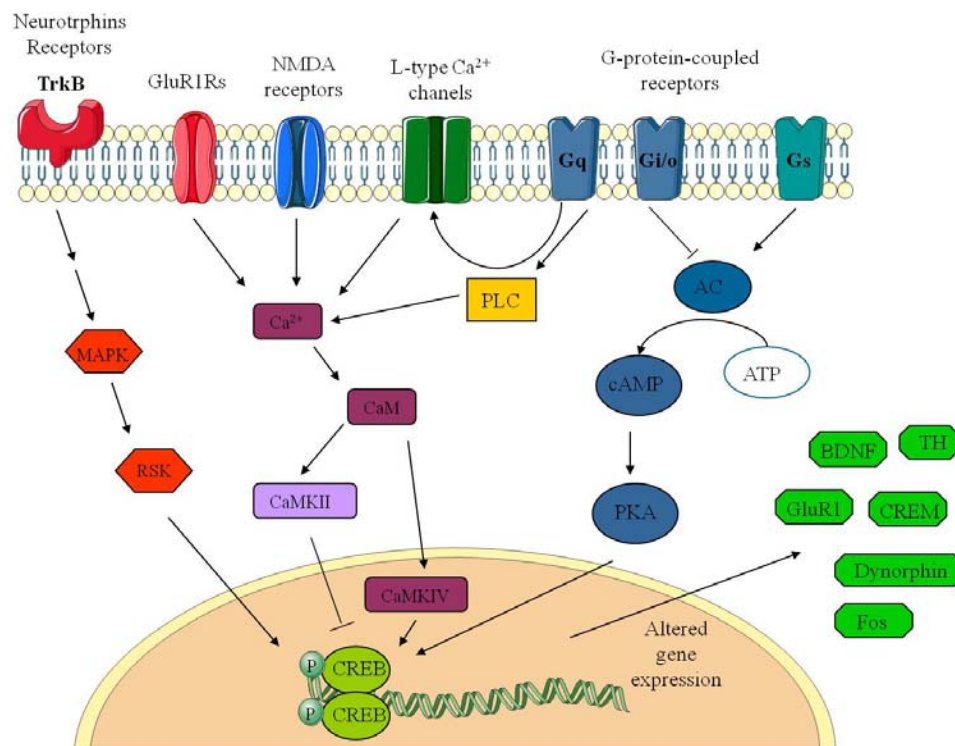


Figure 3: trails and events involved in the activation of CREB. (Adapted from Carlezon WA et al. (Carlezon et al., 2005).

Changes in phosphorylation of CREB and other transcription factors regulate cAMP-dependent transcription of genes that are dependent on the activation of cAMP response element (CREs) (Guitart et al., 1992; Lane-Ladd et al., 1997).

#### 4.1 Modulation of CREB expression by alcohol.

Some studies have shown that chronic ethanol consumption decreases the activity of adenylate cyclase and decreases the expression and function of stimulatory G proteins (Gs) and increased inhibitory G protein (Gi) in rodents (Wand & Levine, 1991). It is also known that PKA-mediated phosphorylation is decreased in the brains of rats chronically treated with ethanol when compared with control rats (Rius et al., 1988). There are various components of the cAMP transduction cascade that are decreased in the brains for ethanol dependence rodents (Wand & Levine, 1991). It is possible that the function of gene transcription factor CREB is altered in ethanol dependence.

CREB plays a central role in the process of addiction (Nestler, 2001; Carlezon et al., 2005; Spanagel, 2009). Ethanol is a pharmacological profile very complex and several signaling systems have been identified as modulators of the function of CREB, which could be used as "target" of ethanol (Spanagel, 2009).

Several studies have focused on the role of CREB and its target genes, such as brain derived neurotrophic factor (BDNF), neuropeptide Y (NPY), the regulatory activity associated with cytoskeleton (Arc) and corticotropin releasing factor (CRF) in the development of alcohol addiction (Heilig & Koob, 2007; Davis, 2008; Pandey et al., 2008; Thorsell, 2008). CREB is believed to play an important role in rewarding and reinforcing effects of many drugs of abuse (Berke & Hyman, 2000; Nestler, 2001; Nestler, 2002). It is known that phosphorylation of CREB has a crucial role in *de novo* synthesis of proteins involved in the maintenance of normal synaptic plasticity (Duman et al., 2000; Josselyn et al., 2001).

There are two cellular pathways leading to phosphorylation of CREB. In the first one, neurotransmitters that stimulate cAMP generation cause phosphorylation of CREB. These neurotransmitters interact with specific G protein-coupled receptors surface; the activation of G protein activates adenylate cyclase (AC) and it is this that generates the formation of cAMP. The cAMP binds to the regulatory subunit of PKA, inducing dissociation and production of its catalytic subunit. The catalytic subunit of PKA translocates into the nucleus and phosphorylates CREB at its serine 133.

In the second proposed route, CREB can be phosphorylated through cAMP independent pathways, e.i activation of protein kinase Ca / calmodulin (Cam kinase IV) by calcium-calmodulin that causes phosphorylation of CREB serine 133 (Figure 3).

The route of the second messenger cAMP appears to be an important target for the effects of both acute and chronic exposure to ethanol in the brain and other cells (Hoffman & Tabakoff, 1990).

Acute ethanol exposure is associated with induction of the phosphorylation of CREB. Prolonged treatment with ethanol is not able to induce phosphorylation of CREB levels achieved during the initial exposure to ethanol. The balance between CREB and its phosphorylated form is dependent on the nuclear content of kinases able to phosphorylate CREB and phosphatases able to dephosphorylate CREB. It is plausible that chronic exposure to ethanol induces phosphatase activity in the nucleus. Some protein serine / threonine phosphatases have been identified in eukaryotic cells, these phosphatases are able to dephosphorylate serine-133 of CREB (Hagiwara et al., 1992; Wadzinski et al., 1993).

Alternatively it is possible that chronic exposure to ethanol causes a reduction in the levels of nuclear kinases that phosphorylate serine 133 of CREB, and thereby reduce the transcription of the gene, in this aspect, the catalytic unit of PKA (PKA-C) and cam kinase IV are possible candidates. Some studies have shown that chronic exposure to ethanol reduces nuclear expression of these kinases in the rat cerebellum. In the case of PKA-C, this could be due to desensitization of adenylyl cyclase cascade by chronic administration of ethanol. It is also possible that chronic ethanol consumption produces a decrease in the biosynthesis of PKA, causing degradation or inhibition of kinase translocation from the cytosol to the nucleus. There are precedents for the ability of ethanol to alter protein trafficking (Diehl, 1992).

Besides the reduction of phosphorylation of CREB, chronic exposure to ethanol also alters the binding activity of CREB. Hence one would predict that because ethanol produces alterations in the phosphorylation of CREB activity and CREB binding would reduce the expression of CRE-dependent genes.

## **5. Brain-derived neurotrophic factor.**

BDNF is a member of the family of cysteine group. Neurotrophic substances also include NGF (nerve growth factor), neurotrophin (NT-3) and NT4 / 5 in mammals. NGF is a survival factor for sympathetic and cholinergic neurons in the CNS. BDNF and NT-4 are widely expressed with high levels in the hippocampus, cerebellum and cortex. BDNF may be produced by astrocytes under pathological conditions (Zafra et

al., 1992; Juric et al., 2006), BDNF is also produced by platelets (Karege et al., 2002) cells (Krause et al., 2008) and the vascular endothelium. It is an angiogenic factor, and is also related to the vascular and hemodynamic response to ethanol.

The neurotrophins initiate signaling events that underlie learning, memory and neuronal plasticity (Fischer et al., 1987; Alonso et al., 2005). The synthesis and release of neurotrophins depend upon the activity, which is consistent with its role as a modulator of resistance and maintenance of synapses (Canossa et al., 1997; Lessmann, 1998).

Neurotrophins initiate their signaling by binding to receptors of low (p75) or high affinity (Trk). Isoforms of high affinity receptors are trkA and trkB, and they preferentially bind nerve growth factor (GNF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF), respectively (Bibel & Barde, 2000; Huang & Reichardt, 2003).

BDNF gene expression is contralateral through four promoters. Of particular interest is the expression of one of them that is regulated by neuronal activity from  $\text{Ca}^{2+}$  flux through  $\text{Ca}^{2+}$  channels. Cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  activates the transcription of BDNF through a signaling cascade involving protein kinase activation of several transcription factors, including CREB. BDNF is induced by neuronal activity and is involved in development, neurite growth, synaptic plasticity, and regulation of dendritic morphology (Poo, 2001; Kuczewski et al., 2009). The activation of TrkB leads to receptor internalization and binding to adapter proteins, Grb2 and SOS, which interacts with the Ras protein, leading to activation of MAPK (Poo, 2001; Reichardt, 2006). BDNF signaling, especially through MAPK, ends in the activation of CREB (Tao et al., 1998; Pizzorusso et al., 2000). Moreover BDNF and TrkB are CREB target genes.

## **6. Neurogenesis in the adult hippocampus.**

Neurogenesis is the production of cells of the central nervous system (CNS), namely neurons and glial cells. The term neurogenesis is used especially in humans, but it also occurs naturally in any animal that has nervous system and therefore nerve cells.

The production of new neurons after birth was denied until the second half of the twentieth century (Ramón y Cajal, 1928). Today we know that both neurons and glial cells are still produced by the differentiation of stem cells throughout the life of organisms (Kuhn et al., 1996).

From the beginning of 1990 numerous studies have shown that new neurons are formed in restricted areas in the adult CNS (Gage, 2000; Kempermann & Gage, 2000; Alvarez-Buylla & Garcia-Verdugo, 2002). In humans, the generation of new neurons was found and described in different parts of the nervous system in the olfactory bulb, hippocampus and in different areas of the cerebral cortex (Kempermann & Gage, 2000; Lledo et al., 2006). It has also been described that neurogenesis occurs in the prefrontal cortex, which controls the process of implementation of decisions and is involved in short-term memory, and in the inferior temporal region, which acts on the recognition of faces or objects in the region posterior parietal, important in the perception of spatial relationships and body image.

The integration of neurons in neural networks follow these steps (Figure 4): 1) stem cell proliferation, 2) development of a progenitor cell, 3) immature neuron differentiation, 4) migration to their final destination, 5) development of axons and dendrites and formation of synapses with other neurons in the circuit, 6) and finally, maturation to a fully functional neuron. Although these steps are the same that in neurons formed during embryonic development, the main difference is that the neurons formed in adult neurogenesis have to do all these steps in a mature environment and have to be incorporated into existing circuits.



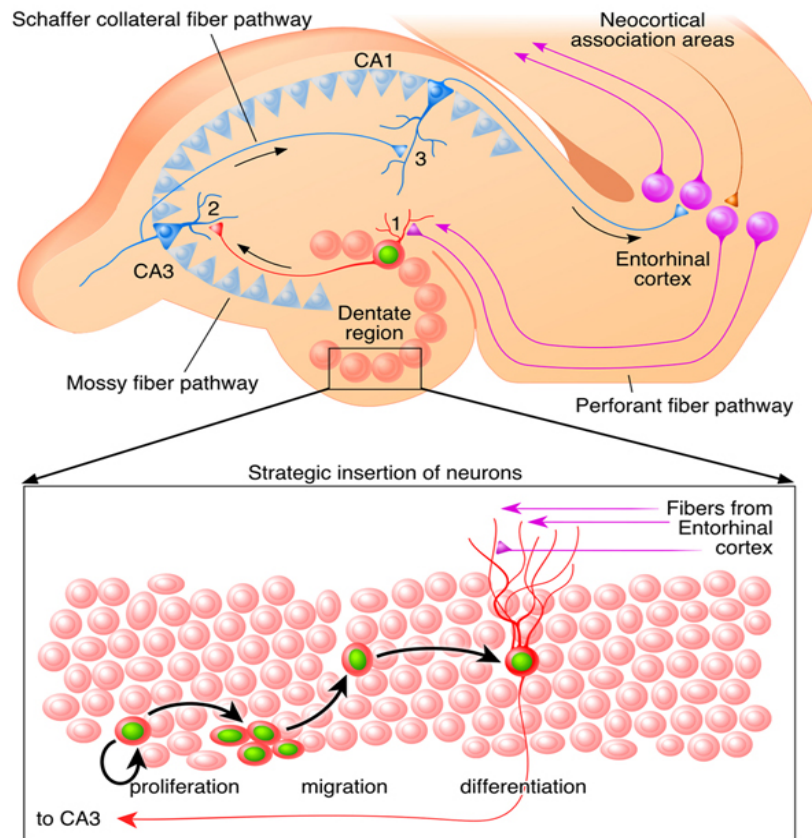


Figure 4. Neurogenesis in the adult hippocampal dentate gyrus. 1. Proliferation: Stem cells (pink) in the subgranular layer of dentate gyrus cells stimulated to differentiate into immature neurons. 2. Migration: Immature neurons migrate to the subgranular layer of the dentate gyrus. 3. Integration: Immature neurons mature into new granule neurons by stimulation of the entorhinal cortex and extend their projections to CA3. Adapted from Lie et al (Lie et al., 2004).

The fact that new neurons are formed throughout life in the CNS, not only provides a unique model for understanding the basic mechanism of neuronal development in the adult CNS, but also opens the possibility to stimulate this process as a new strategy for therapy for CNS diseases.

## 6.1 Survival and proliferation markers.

### 6.1.1 Bromodeoxyuridine (BrdU).

Bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU) is a synthetic nucleoside analogue of thymidine. BrdU technique is commonly used to detect dividing cells in

living tissue because BrdU can be incorporated into newly synthesized DNA in proliferating cells (S phase cell cycle), replacing the thymidine for DNA replication. Specific antibodies are used to detect BrdU this means that BrdU-labeled cells would be in a phase of cell proliferation (Gross, 2000). Antibody binding requires the denaturation of DNA, usually by exposing the cells to acid or heat.

At present the use of BrdU is one of the main techniques for labeling neuronal proliferation in order to characterize the changes of this phenomenon occurring during certain diseases. Rao et al. demonstrated that reduction of neurogenesis in adult rats also produced as a significant decrease in learning (Rao et al., 2006). Currently, it has been described the reduction of neurogenesis in the dentate gyrus in several diseases such as myocardial infarction and ischemia (Kuan et al., 2004), diabetes (Saravia et al., 2004) alcoholism (Herrera et al., 2003 283) and that different antioxidants can protect this process.

### **6.1.2. Doublecortin.**

Doublecortin (DCX) is an endogenous marker for studying adult neurogenesis and morphology of newly formed neurons (Rao & Shetty, 2004). DCX is expressed in the early cells that are designated to become neurons (Brown et al., 2003). DCX is a phosphoprotein associated with the microtubule cytoskeleton that contributes to the reorganization of microtubules, and is expressed both in cytoplasm and dendrites of new neuroblasts during dendritic elongation and arborization neurons. The full development of the dendritic tree suggests that neurons have matured and are being integrated properly in the hippocampal circuit, which is a process required for proper function of the hippocampus (Schmidt-Hieber et al., 2004).

DCX expression starts early during the first hours after cell division and remains for a period of a few weeks (Figure 5), during this period the cells migrate, differentiate and extend their dendritic trees, gradually transformed into neurons . As soon as the cells mature into neurons and NeuN expression begins, DCX immunoreactivity decreased dramatically (Brown et al., 2003).

Thus the pattern marked by DCX is useful to study the morphological changes of newly formed neurons. It also provides independent validation of the proliferation of neural progenitor cells and neurogenesis.

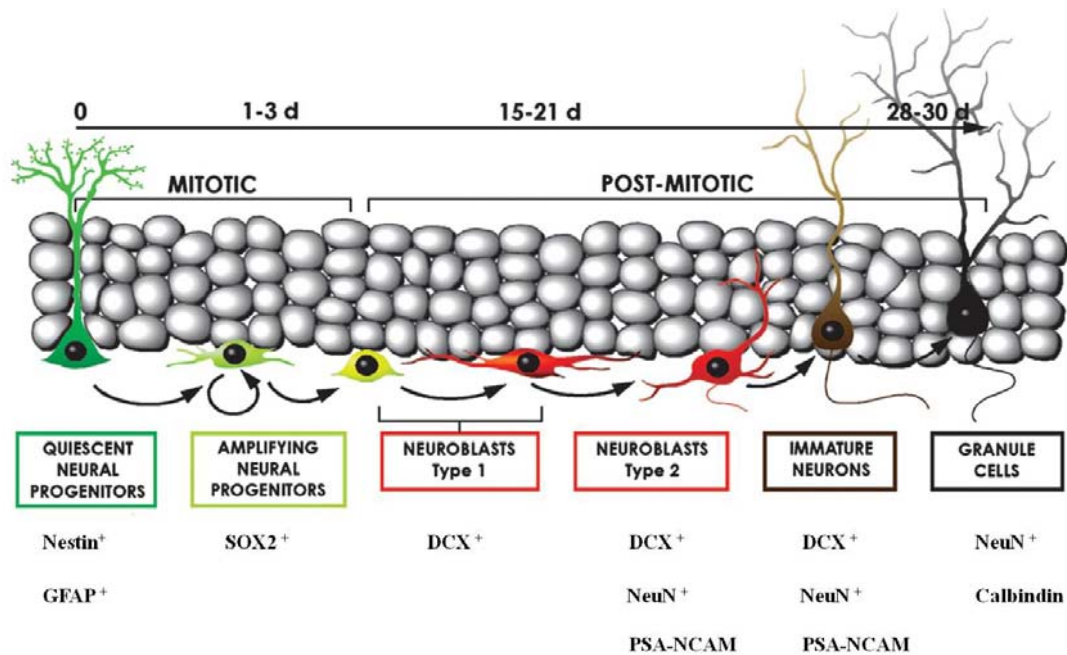


Figure 5: Diagram of the neuronal differentiation cascade. Adapted from (Encinas et al., 2006).

## 6.2 Neurogenesis and ethanol.

It has been shown that many factors, both endogenous and exogenous, regulate the different stages of adult neurogenesis. Hormonal and neuroendocrine factors, neurotransmitters and growth factors, stress, physical activity, learning and memory, environmental complexity and pharmacological agents, including substances of abuse, have been implicated in one way or another in the regulation of neurogenesis in the adult central nervous system (Ming & Song, 2005; Christie & Cameron, 2006). The proven fact that exposure to drugs of abuse negatively affects the ability of self-renewal of adult hippocampus provides growing speculation of the potential role that addiction has on neurogenesis, as is the case with cocaine (Canales, 2007).

In this sense alcohol has been one of the most studied drugs in recent years. Initial investigations showed that acute administration decreased cell proliferation in the dentate gyrus (DG) (Nixon & Crews, 2002). The same authors found that damage to proliferation after acute consumption of ethanol was followed by a sharp increase in proliferation one week after exposure to alcohol, and increased doublecortin expression in the DG two weeks after treatment (Nixon & Crews, 2004). These data suggest the compensation and reversibility of the effects of acute administration of ethanol on cell proliferation after withdrawal.

Neurogenesis, namely the survival of newly formed cells, and long-term potentiation (LTP) in the hippocampus is significantly altered in rats chronically treated with liquid diet containing ethanol (Herrera et al., 2003; Johnsen-Soriano et al., 2007a). These reports involve oxidative stress as a contributing factor to cell death as the administration of an antioxidant such as ebselen prevents the toxicity induced by ethanol in hippocampal cells. In turn, chronic treatment with ethanol produces a progressive decrease in learning and memory, as has been observed in a variety of behavioral studies (Walker & Freund, 1971; Walker & Freund, 1973; Fehr et al., 1976).

The deficit in cognitive functions dependent on hippocampus has been observed after chronic exposure to liquid diets containing alcohol. These models also reproduce many of the observed effects of alcoholism in humans, including changes in the liver, gastrointestinal effects and peripheral neuropathy (Lieber et al., 1989 618). Knowing the changes that occur in the brain caused by alcohol, it is crucial to develop new therapies.

## **7. Oxidative stress and free radicals.**

Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the former (Sies, 1991 100). Aerobic life is characterized by a constant production of pro-oxidants that is balanced by the disappearance due to antioxidants.

Free radicals are all those molecules that contain in their outermost orbital an unpaired electron. Free radicals tend to react avidly with other nearby molecules to complete the incomplete orbital, thereby destabilizing the electronic configuration of molecules with which they react, turning them down into reactive species and initiating a chain reaction.

### **7.1 Physiological role of free radicals.**

It has been demonstrated the role of free radicals in the antimicrobial and antitumor defense, as well as messengers and inductors of genes (Satriano et al., 1993; Zimmerman et al., 2002; Al-Shabrawey et al., 2008; Hardy, 2004). They may be involved in the inactivation or activation of certain enzymes, (Fillebeen & Pantopoulos, 2002; Minamiyama et al., 2007), or contribute to the regulation of the extent of the inflammatory process (Bourbon et al., 2004). In addition, it has been postulated that oxidant-antioxidant balance may be involved in the process of apoptosis (Gupta et al.,

2007; Svensk, 2004). Nitric oxide is involved in regulating functions in the immune, cardiovascular and nervous systems (Mayer & Hemmens, 1997).

## **7.2. Pathogenic role of free radicals.**

Free radicals have been related with hypertension (Touyz, 2004), cardiovascular dysfunction (Ramachandran et al., 2003a), inflammation (Telfer & Brock, 2004), and diseases such as diabetes (Muriach et al., 2006; Miranda, 2004; Hermenegildo, 1993; Johnsen-Soriano et al., 2007a; Arnal et al., 2010), AIDS (Jareno et al., 2002) etc. These radicals can directly or indirectly affect several cellular and physiological mechanisms, and may lead to alterations of vital, including DNA (causing mutations), membrane lipids (causing their peroxidation) and protein (by altering enzyme activities) and ultimately can produce apoptosis and neuronal death .

## **7.3 Lipid peroxidation.**

Lipid peroxidation is the oxidative deterioration of fats, especially polyunsaturated fatty acids. It usually occurs when the hydroxyl radical ( $\bullet$  OH) is generated in the vicinity of the membranes and attack the polyunsaturated fatty acids of phospholipids, such as arachidonic acid.

An  $\bullet$  OH can convert hundreds of membrane fatty acids in hidroperoxidates lipids, which are very unstable and quickly decompose into other products, being able to produce new free radicals that can in turn initiate new peroxidation chains.

### **7.3.1 Products of lipid peroxidation.**

Among the various aldehydes produced in the peroxidation of lipids, the most intensively studied have been malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals, including 4-hydroxynonenal (HNE) and 4-hydroxyhexenal (Esterbauer et al., 1991).

Malondialdehyde (MDA).

MDA is a volatile molecule, low molecular weight (MW = 72.07), with a 1,3-dicarbonyl group (Figure 6). In solution and gas phase, MDA is entirely enolized and maintained through an intramolecular hydrogen bond balance in two asymmetrical forms.

MDA results from the oxidative degradation of polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic acid. Since this compound is a common end product of lipid peroxidation independently of oxidized polyunsaturated fatty acid, its determination has been widely accepted as a marker of this process (Halliwell, 2000 85; Bunnag, 2006 84; Surekha et al., 2007).

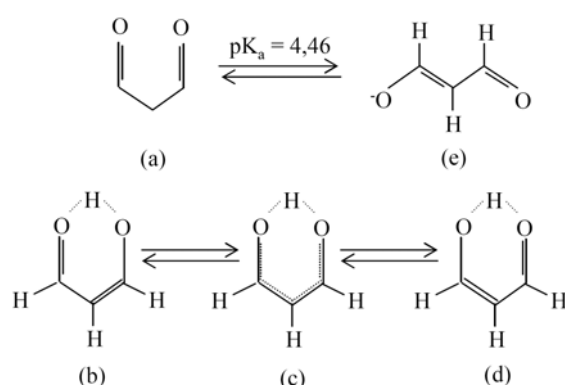


Figure 6. Chemical structure of the MDA, (Janero, 1990 80)

Since oxidative stress and lipid peroxidation have been implicated causally in the pathogenesis of some human diseases, the determination of residual products of lipid peroxidation such as MDA, in tissues or body fluids, has received considerable attention. So far, the mostly used techniques are based on the reaction of MDA with thiobarbituric acid. The literature points to the determination of MDA by HPLC as one of the most appropriate to reflect the rate of lipid peroxidation of a biological sample, and this is precisely the one used herein.

#### 7.4 Antioxidant defenses.

An antioxidant is defined as any substance which, when present at low concentrations compared to the oxidizable substrate, significantly delays or prevents oxidation of that substrate (Halliwell & Gutteridge, 1986 73). The term "oxidizable

substrate" includes almost any macromolecule that is found in living cells, such as proteins, lipids, carbohydrates and DNA.

Detoxification of reactive oxygen species is a prerequisite for aerobic life, so an important antioxidant defense system has been developed that consists of collectors and neutralizers, called non-enzymatic antioxidants (vitamins C and E, glutathione, etc..), and direct antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, etc.), and enzymes with high antioxidant activity, which contribute to the maintenance of other antioxidant systems (glutathione S-transferase, glucose 6-phosphate dehydrogenase, etc.) (Sies, 1991 46).

#### **7.4.1 The glutathione system.**

The glutathione system, include glutathione and the enzymes related to its metabolism, which are also responsible for maintaining the redox state under physiological conditions (Meister & Anderson, 1983 87). Glutathione is a tripeptide (consisting of glutamic acid, cysteine and glycine) of interesting biological properties due to two structural characteristics: the  $\gamma$ -glutamyl bond that protects peptidases, and the presence of a free thiol group which makes it a very reactive compound with all kinds of substances and even itself (Meister & Anderson, 1983 87). It is the most abundant nonprotein thiol in virtually all animal cells (Dringen, 2000 88) and its presence can be explained by its role in protection against oxygen toxicity. Glutathione is considered to be in equilibrium between the different ways that this tripeptide may occur (Kosower & Kosower, 1978 89): it can be found in the form of reduced thiol (GSH), oxidized form (GSSG) and mixed disulfides GS-S-protein. Glutathione is related to the activity of some enzymes such as:

-Peroxidase activity, represented by three enzymes:

1. Glutathione peroxidase (GPx) is a selenoenzyme, which can reduce hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) to water. It is the most common form of peroxidase activity in mammals and it is an important protective system against lipid peroxidation. The function of this enzyme is to protect cell membranes from oxidative damage. The liver is exposed to high levels of oxidants and it has a high activity of glutathione peroxidase. Animals deficient in selenium have a lower activity of this enzyme (Van Vleet et al., 1981).

2. Glutathione transferase with peroxidase action: Some isoenzymes of glutathione S-transferase also have activity against organic hydroperoxides. Under conditions of selenium deficiency in the rat, glutathione peroxidase is decreased while glutathione transferase activity is increased (Schramm et al., 1985).

3. Glutathione peroxidase against peroxidized phospholipids: it acts on oxidized phospholipids of biological membranes. It is a monomer and was discovered as a seleno enzyme distinct from the classical GPx based on its cDNA and amino acid sequence .

#### **7.4.1.1 Mitochondrial glutathione**

GSH is synthesized in the cell cytosol and its availability in different cellular compartments is determined by complex interactions between its use, transport, synthesis and the rate of reduction of GSSG to GSH. Mitochondrial glutathione (mGSH) in different tissues is 10-15% of total GSH in the cell and shows a similar concentration to that of the cytosol (Romero & Sies, 1984; Garcia-Ruiz et al., 1994).

The main functions of the mGSH are:

- Reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generated by mitochondrial respiration.

As a result of cellular aerobic metabolism, superoxide radicals and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as by-products of mitochondrial respiration, reactive species that can lead to oxidation of membrane lipids and other macromolecules, interfering with metabolic processes. Since mitochondria lack the enzyme catalase, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification depends exclusively on mitochondrial glutathione and GPx enzyme activity (Fernandez-Checa et al., 1997).

- Maintenance of cell viability.

mGSH has a key role in cell viability (Fernandez-Checa et al., 1998b). For example, it was observed that the selective decrease in the levels of mGSH is an event that precedes apoptotic death in thymocytes (Macho et al., 1997) and sensitizes the hepatocytes against oxidative stress and TNF- $\alpha$  (Colell et al., 1997; Fernandez-Checa et al., 1997). It also plays a key role in maintaining mitochondrial function by regulating the permeability of the inner mitochondrial membrane by maintaining sulfhydryl groups in their reduced state (Armstrong et al., 2002).



## 7.5 Alcohol and oxidative stress.

Ethanol can exert its toxic action either by a direct effect because of the generation of free radicals or through its metabolites, mainly acetaldehyde (Nordmann, 1994).

The liver is the main target organ for toxicity of ethanol and has been repeatedly confirmed the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of alcoholic disease in this tissue (Rouach et al., 1997). One mechanism to explain the origin of this oxidative stress is the generation of free radicals in the metabolism of the ethanol molecule by ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1 isoenzyme), which generate significant amounts of superoxide radical and hydrogen peroxide (Lieber, 1997; Lieber, 2004), and 1-hydroxyethyl radical (Albano et al., 1987).

Another source of 1-hydroxyethyl radical comes from the oxidation of ethanol in the presence of traces of iron by hydrogen peroxide (McCord, 1998). After chronic ethanol consumption, there is an induction of CYP2E1, which is associated both with increased ethanol metabolism, as inactivation of xenobiotics to toxic metabolites (Lieber, 2004).

Thus, it has been shown experimentally that chronic alcohol consumption leads to an increase in lipid peroxidation products and decreased antioxidant factors and enzymes such as glutathione derivatives (Schlorff et al., 1999). Alcohol consumption has also been associated with the conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase, a process that can produce oxidative stress (Sultatos, 1988). Ethanol also causes damage to mitochondria, resulting in a decrease of the production of ATP (Koch et al., 2004).

Similarly oxidative stress has been described as the main factor involved in the alterations resulting from chronic consumption in both the central nervous system, brain (Johnsen-Soriano et al., 2007a), cerebellum (Rouach et al., 1997) and peripheral nerves (Bosch-Morell et al., 1998). Several studies (Tabuchi et al., 1995; Kono et al., 2001) have shown that the use of antioxidants can prevent liver and gastric mucosa damage caused by alcohol. Several others antioxidants have also been used to reduce ethanol-induced neuropathy (Bosch-Morell et al., 1998 238; Johnsen-Soriano et al., 2007a).

## **8. Mitochondria.**

Mitochondria are cytoplasmic specialized organelles in energy production, resulting in the synthesis of ATP from ADP. Moreover mitochondria provide the energy needed for cells to carry out their multiple functions, in the other hand, in recent years it has been emphasized their role in regulating cell death by acting as a store of apoptogenic proteins.

### **8.1. Structure and composition.**

Mitochondria are mobile and flexible organelles, they have an average diameter of 0.5-1  $\mu$ m, and its association with microtubules determines the orientation and distribution typically observed in the cytoplasm of different cell types.

The basic structure of mitochondria consists of two highly specialized membranes. There is an outer membrane that is in contact with the cytoplasm, and there is an internal membrane with invaginations entering the mitochondrial matrix (Figure 7). Both membranes enclose two different compartments, the intermembrane space and the mitochondrial matrix. In the intermembrane space there are various pro-apoptotic proteins, adenylatekinase enzyme that converts AMP to ADP, which is rapidly phosphorylated to ATP. With the help of this enzyme, the cytosolic AMP can be used to regenerate ATP. Moreover, the mitochondrial matrix contains the machinery involved in protein synthesis (DNA, RNA and ribosomes) and it is where Krebs cycle reactions occur.

The outer membrane composition is analogous to the cytoplasmic membrane and the endoplasmic reticulum. It contains 40% of fat and 60% of proteins, mainly enzymes such as acyl-CoA synthetase, NADH-cytochrome b5 reductase, monoamine oxidase and the voltage-dependent anion channel (VDAC). This channel is responsible for the outer membrane filtering action, permeable to molecules under 5000 Da. Most substrates can not cross the inner membrane, causing that the intermembrane space is equivalent in chemical composition to the cytosol.

The composition of the inner membrane differs in many aspects of the external, being much higher in protein (80%) due to the presence of large numbers of specific transporters and enzyme complexes of the respiratory chain constituents.

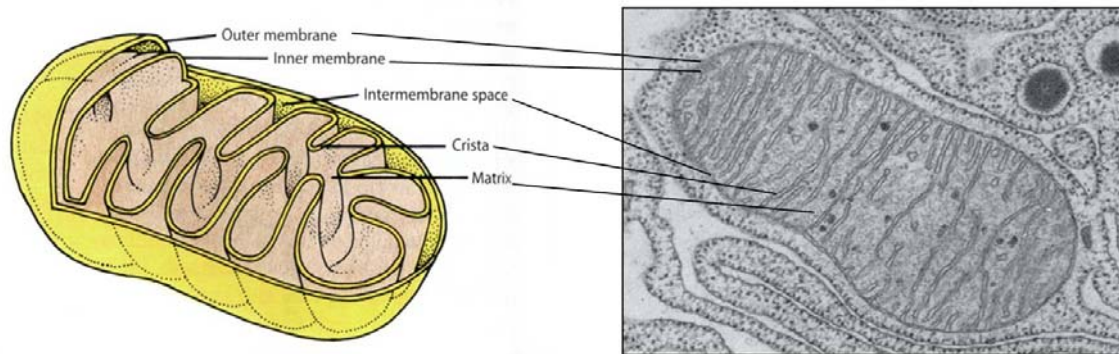


Figure 7: Diagram of mitochondrial structure and mitochondria by transmission electron microscope (60.000X).

## 8.2. Transport and mitochondrial permeability.

While the outer membrane is permeable to most solutes, the inner membrane is impermeable and can only be spread through her small neutral molecules such as oxygen, water, carbon dioxide ... The remaining passive and active transports are carried out through the membrane, and it is controlled by specific channels or transporters (Figure 8).

For oxidative phosphorylation, mitochondria needs to import from the cytosol, ADP and inorganic phosphate, while the ATP generated in this process is released into the cytosol, involving two transporters present in all mitochondria: the ADP / ATP translocator (ANT) and the inorganic phosphate transporter (Palmieri et al., 1993).

The mitochondrial matrix is negatively charged due to the pumping of protons across the mitochondrial membrane, so the transport of any anion is affected by the membrane potential.

The process of mitochondrial permeability transition (MPT) is characterized by an increase in the permeability of the inner mitochondrial membrane to solutes smaller than or equal to 1500Da (Hunter et al., 1976). The opening of this nonspecific channel, allows a balance between the ions of the matrix and mitochondrial intermembrane space, dissipating the proton gradient and uncoupling the respiratory chain. In addition, there is a swelling of mitochondria due to hyperosmolality of the matrix. As the inner membrane is invaginated and it has more surface area than the outer membrane, expanding the volume of the matrix can cause the permeability and/or outer membrane rupture, releasing the mitochondrial intermembrane space proteins.

Mitochondrial permeability pore is controlled by a voltage-dependent calcium channel (Bernardi et al., 1994). This multiprotein complex is located in the binding sites between the inner and outer mitochondrial membrane, and thus pore opening allows communication between the mitochondrial matrix and cytosol. It is not known the exact composition of the mitochondrial pore, although some of its components have been described. Among those who form the core of the pore is the adenine nucleotide translocator (ANT) and voltage-dependent anion channel (VDAC).

Many agents that cause mitochondrial pore opening are ligands of ANT, the atractyloside is one of them (Halestrap & Davidson, 1990).

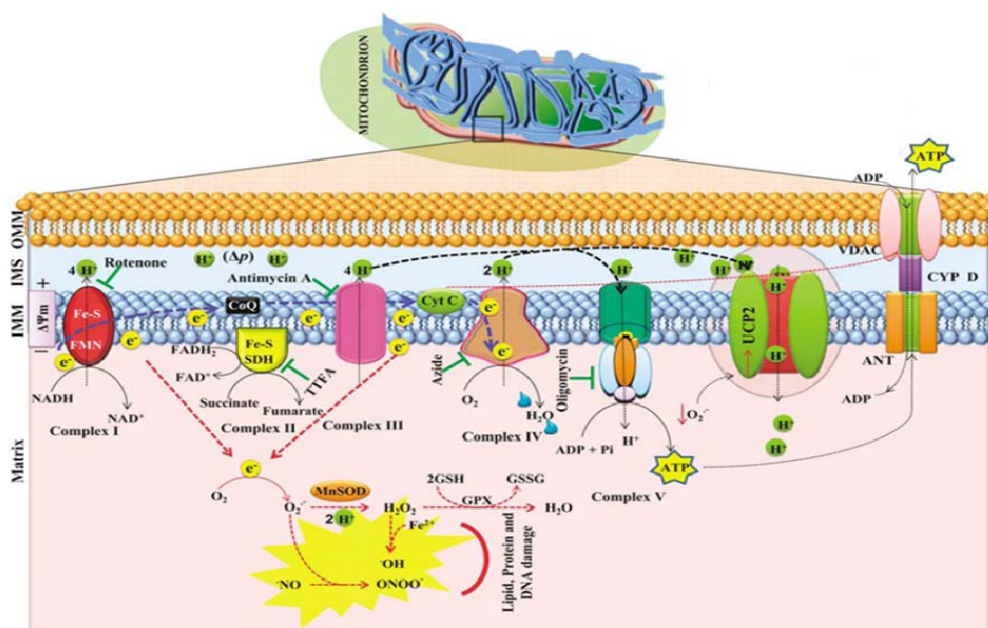


Figure 8: Scheme of transporters in the membranes of mitochondria. Modified from L. Suresh et al. 2009 .

## **II. HYPOTHESIS AND OBJECTIVES**

The working hypothesis of this study would argue that the mechanism of naltrexone (antagonist of  $\mu$ -opioid receptors) reason why it is used as adjuvant in the treatment of alcohol deshabituation, would be related to oxidative stress and some cell signaling pathways related to stress. Thus we established the following goals:

1 - To characterize the changes induced in the rat brain in experimental model of chronic alcohol consumption, studying the possible involvement of oxidative stress (lipid peroxidation, concentration and / or activity of antioxidants), their relationship to signaling pathways and neurogenesis .

2 .- To test the effect of naltrexone treatment on possible changes observed after chronic ethanol consumption.



### **III. RESEARCH DESIGN AND METHODS**

#### **1. Experimental design.**

##### **1.2. Liquid diet administration.**

All experiments in this study were based on the chronic alcohol rat model, which was administered to rats feeding of Lieber-De Carli diet (Lieber et al., 1965) obtained from commercial house Test Diet (London) . Briefly, the model of chronic alcoholism is administered alcohol liquid diet (5% v / v) for six weeks. The rats were separated into two groups and were administered alcohol liquid diet or control liquid diet. Control group received alcohol rather than an isocaloric mixture with maltose dextrinated substituting ethanol. The rats were divided into ethanol-control pairs with similar weight, administered to the rat diet control the volume of ethanol ingested by rats the previous day. The amount of diet consumed per day ranged between 80-120 ml.

We modified this model to induce withdrawal 24 hours rats. All ethanol rats 24 hours before sacrifice are given control diet.

##### **2.2 Administration of naltrexone**

At 5<sup>th</sup> week rats were divided into four groups: control, control-naltrexone, ethanol, ethanol-naltrexone. Naltrexone was administered daily for the last two weeks of consumption of the diet, by intraperitoneal injection (1mg/kg). The rats that were not given naltrexone were injected the same volume of saline (Figure 9).

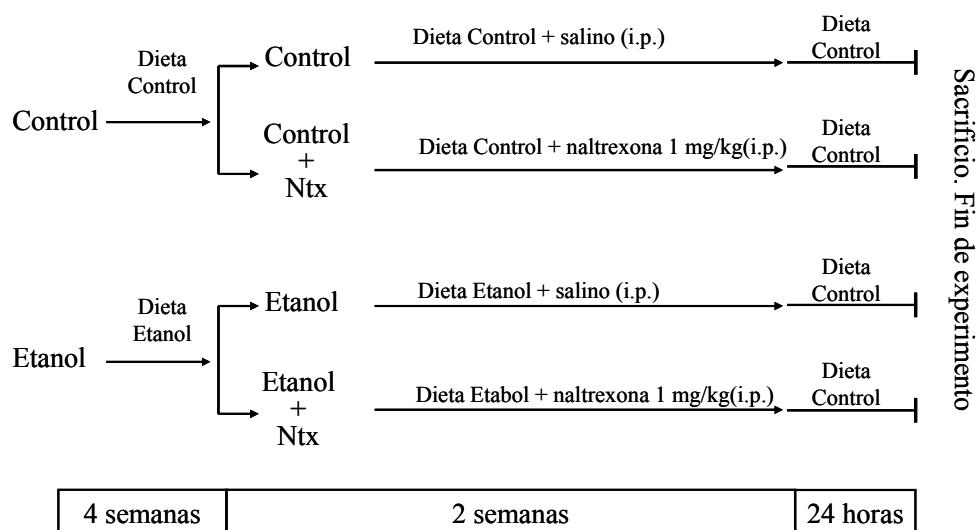


Figure 9: Experimental design.

### 2.3 Bromodeoxyuridine administration (BrdU).

It followed the BrdU administration protocol for the study of cell survival as described by Herrera et al. 2003, (Figure 10) (Herrera et al., 2003).

During the first 10 days of the experiment the animals received a daily intraperitoneal injection of BrdU (40 mg/kg), a marker of cell proliferation, the last day of the experiment animals were perfused as described in the following paragraphs.

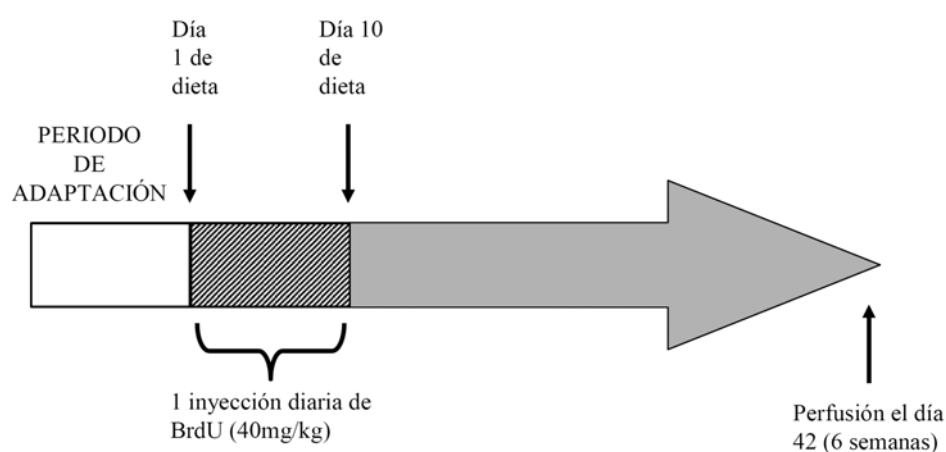


Figure 10. BrdU experimental design.



### **3. Collection of samples.**

#### **3.1 Serum.**

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection (ketamine, 100 mg/kg; azepromazina 2.5 mg/kg) the blood was extracted directly from the heart, using a syringe. Then blood was centrifuged for 2 minutes at 9000 rpm and supernatant was removed.

#### **3.3.2 Hippocampus.**

After slaughter of animals, we proceeded immediately to the removal of the hippocampus. The samples were homogenized in 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7, with a homogenizer Ultraturrax T25. The homogenates were stored at -20 ° C until used for protein determination, MDA and glutathione peroxidase.

For the determination of glutathione, immediately after homogenization, 360 mL acidified this homogenate with 40 mL of 20% perchloric acid, centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes and the supernatant was collected, which were stored at - 20 ° C until use.

In the case of the immunohistochemical study, for obtaining brain slices after the first infusion of rats with saline to clear blood and debris and then with 4% PFA fixative solution 0.1M PBS, pH 7.4, was extracted the whole brain, and kept 12 hours in the same fixative solution at 4 ° C. Subsequently changed to a PBS-sucrose solution by 30% between 24-48h at 4 ° C. And finally included in cryobloc compound (DiaPath) and others are stored at -80 ° C. Then they were cut by cryostat as described below.

#### **3.3 Mitochondrial extraction.**

Mitochondria were extracted by differential centrifugation of whole brain homogenates from rats. After sacrificing the rat brain was extracted and immediately homogenized with a volume of mannitol buffer. Mannitol buffer consists of 210 mM mannitol, 60 mM sucrose, 10 mM KCl, 10 mM sodium succinate, 0.1 mM EGTA and 10mM HEPES, at pH 7.4)

This brain with that volume of mannitol buffer was homogenized with Teflon homogenizer 4 times at 1200 rpm. This one milliliter homogenate reserves to be used for determinations in total brain homogenate.

The remaining homogenate was centrifuged at 700 g for 10 min at 4 ° C, the pellet is discarded and the supernatant was centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 ° C.

The precipitate obtained by this centrifugation was resuspended in mannitol buffer having a final volume of 4 ml. These are divided into two ultracentrifuge tubes with 8 ml of a solution of mannitol to 30% percoll and centrifuged at 27,700 rpm for 35 minutes at 4 ° C. After ultracentrifugation it shows a band corresponding to the mitochondrial fraction, just above the percoll pellet, this band is removed and washed with mannitol buffer by centrifuging at 10,000 g for 15 min at 4 ° C. The precipitate was resuspended with a small volume of mannitol buffer, it having already prepared for the different determinations.

#### **4. Biochemical assays.**

##### **4.1. MDA determination.**

MDA, a lipid peroxidation product, concentration was measured by liquid chromatography according to a modification of the method of Richard as previously described (Romero et al., 1998). Briefly, 0,1 ml of sample (or standard solutions prepared daily from 1,1,3,3-tetramethoxypropane) and 0,75 ml of working solution (thiobarbituric acid 0,37% and perchloric acid 6,4%; 2/1, v/v) were mixed and heated to 95°C for 1 h. After cooling (10 min in ice water bath), the flocculent precipitate was removed by centrifugation at 3,200 x g for 10 min. The supernatant was neutralized and filtered (0,22 mm) prior to injection on an ODS column 5 mm column (250 x 4,6 mm). Mobile phase consisted in 50 mM phosphate buffer (pH 6.0): methanol (58:42, v/v). Isocratic separation was performed with 1.0 ml/min flow (HPLC System 325, Kontron) and detection at 532 nm (UV/VIS HPLC Detector 332, Kontron). Calibration curves were run daily.

##### **4.2. Gpx activity.**

GPx activity was assayed as reported by Lawrence (Lawrence et al., 1978) towards hydrogen peroxide. The disappearance of NADPH was followed spectrophotometrically at 340 nm. The reaction mixture consisted of 240 mU/ml of glutathione disulfide reductase, 1 mM GSH, 0,15 mM NADPH in 0,1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 1 mM EDTA and 1 mM sodium azide; 50 ml sample were added to this mixture and allowed to equilibrate at 37 °C for 3 min.

reaction was started by the addition of 1.5 mM hydrogen peroxide to adjust the final volume of the assay mixture to 1 ml.

#### **4.3. GSH determination.**

The GSH content of hippocampus was quantified by the method of Reed (Reed et al., 1980). Briefly, eyes were homogenized in prechilled medium containing phosphate buffer (pH 7.0) and perchloric acid (PCA). Suspensions were centrifuged at 14000 x g and the resulting supernatants were collected and stored at  $-80^{\circ}$  C. The samples were mixed with a solution of iodoacetic acid and Sanger reagent (1-fluor-2,4-dinitrobenzene). These products are quickly separated by HPLC which allows the quantification of nanomolar levels of GSH.

Protein content was measured by means of the Lowry method (Lowry et al., 1951).

#### **4.4 Free cholesterol determination.**

The levels of free cholesterol are measured by the method of Duncan (Duncan et al., 1979). A 500 $\mu$ l sample was added 300 $\mu$ l of 33% KOH and 3 ml of ethanol 96% and without saponification is added 3 ml of hexane and water 900 $\mu$ l distilled. All this is stirred vigorously and collected 1 ml of the organic fraction. Prior to the measurement is returned with isopropanol. In each experiment, prepare a blank and a standard calibration curve (0, 5, 10, 20, 40, 80 and 100 mg). The peak area obtained is directly proportional to the concentration of cholesterol in the sample, estimated by intra- and in the regression line obtained with standards.

Measured cholesterol levels with a Gilson model 322 and HPLC using a Waters Bondapak C18 column (30cm x 4mm) being the mobile phase 2-propanol/acetonitrile (1:1 v / v) at a rate of 1ml/min.

#### **4.5. Determination of antioxidant capacity.**

Total antioxidant capacity was measured using a commercial ELISA kit (Antioxidant Assay kit, Cayman Chemical Company). The method is based on the ability of antioxidants in the sample to inhibit oxidation of ABTS (2,2'-azino-di-[3-

ethylbenzthiazoline sulphonate]) to ABTS + by metmyoglobin. The amount of ABTS + produced can be estimated by reading the absorbance at 750 nm i 405 nm. Under the reaction conditions, the antioxidants in the sample cause suppression of the absorbance at 740nm or 405nm is proportional to its concentration. The ability of antioxidants in the sample to prevent ABTS oxidation is compared with that of Trolox, a water-soluble tocopherol analogue, and quantified in millimolar Trolox equivalents.

#### **4.6. Immunohistochemistry.**

Briefly, cryosections will be first incubated for 60 minutes in blocking solution; phosphste-buffered saline (PBS) containing 1% BSA, 5% normal goat serum and 0,5% Triton X-100. This will be followed by overnight incubation with the diluted primary antibody at 4°C. Binding of the primary antibodies will be detected using washings and application of secondary antibodies. The reaction was developed with DAB (Dako). Sections were covered with DPX mounting media for microscope analysis. Scion Image was used to quantify.

#### **4.7 Statistical analysis.**

The results are presented as mean values  $\pm$  SE. Statistical significances were assessed by ANOVA followed by the t-Student test. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## IV.RESULTS

### 1 Time course of diet consumption and weight of experimental animals.

The average daily amount ingested by the control group was  $78 \pm 18$  ml, while in the ethanol group was  $80 \pm 15$  ml. The average amount ingested by the control-naltrexone group was  $76.81 \pm 18.4$  ml and in the ethanol-naltrexone group was  $78.07 \pm 12.0$  ml. There were no statistically significant differences in the average amount of diet consumed by different groups ( $p > 0.05$ ), which represents a caloric intake not significantly different.

The time course of the average weight of rats is shown in Figure 11. The mean initial weight was  $284 \pm 26$  gr in the control group, while at the time of sacrifice it was  $398 \pm 12$  gr, similar to other groups such as it is expressed in the Table 1. There were no statistically significant differences in weight variation between groups in any phase of the experiment ( $p > 0.05$ ).

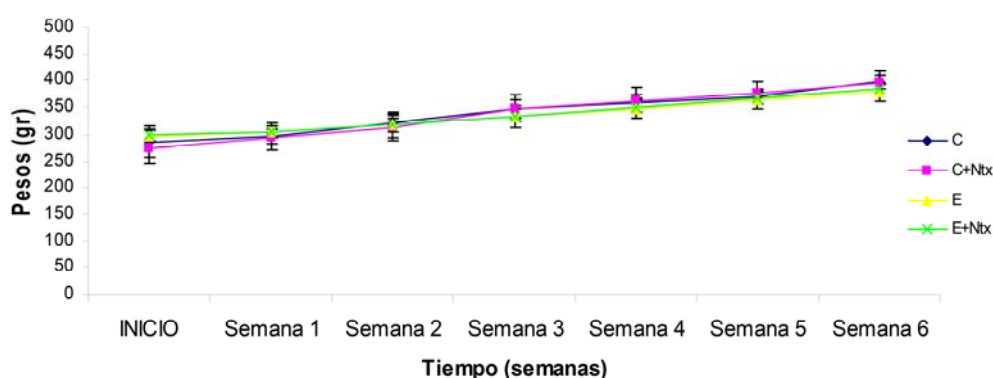


Figure 11: Time course of the average weight of rats over the 6-week of study, n = 8 per group.

	Beginning experiment	End experiment
Control	$284 \pm 26$	$398 \pm 12$
Ethanol	$299 \pm 7$	$384 \pm 17$
Control + Naltrexone	$277 \pm 36$	$394 \pm 19$
Ethanol + Naltrexone	$302 \pm 6$	$383 \pm 7$

Table 1: Weight (g) at the beginning and at the end of the experiment; n = 8 per group. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

## 2. Blood alcohol levels.

The average levels of blood ethanol levels in rats after the fourth week were of  $14.42 \pm 5.82$  mmol / l. These data are consistent with many previous studies that have used this model and that are clinically relevant (Lieber et al., 1989).

## 3. Antioxidant capacity of naltrexone.

Naltrexone, as explained in the introduction, acts as an antagonist of  $\mu$ -opioid receptors and in this property lies its pharmacological functions as an adjunct in the treatment of alcohol wean. But today the effect of the administration of naltrexone in other pathologies are being studied, some of these studies have attributed to naltrexone antioxidant properties. For this reason we wanted to determine the antioxidant capacity of naltrexone, measuring the total antioxidant capacity of different solutions of increasing concentrations of naltrexone. As explained in the section of materials and methods, the kit of antioxidant capacity is based on the ability of the sample to inhibit oxidation of ABTS, ie the higher the concentration of  $ABTS^+$ , indicating a lower antioxidant capacity. As shown in Figure 12, solutions of higher concentration of naltrexone have higher antioxidant capacity, in a statistically significant manner, as they prevent further oxidation of ABTS.

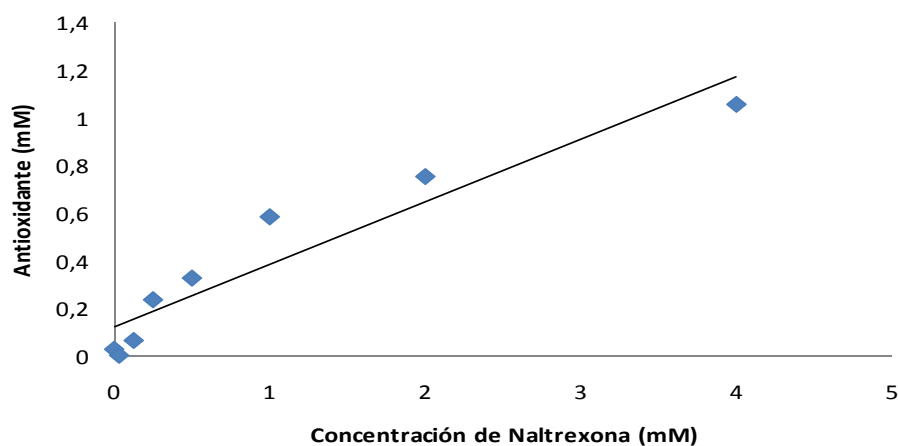


Figure 12: Total antioxidant capacity,  $r = 0.9472$ .  $p < 0.001$ .

---

## **4 Study of serum.**

### **4.1 Biochemical parameters.**

To study whether ethanol consumption affects the oxidative stress and whether naltrexone is able to reverse this effect, we measured biochemical parameters, antioxidant defenses such as GSH or GPx activity and lipid peroxidation products like MDA. The increased in MDA or the decrease in antioxidant defenses would lead to an increased oxidative stress, according to the definition given by Sies (Sies, 1985).

We study oxidative stress in serum to have a systemic or general value of the redox state of the animal, and in the hippocampus, because it is the brain area of interest as previously described in the introduction.

All results presented in this paper are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, the samples are obtained on the last day of the experiments.

#### **4.1.1 MDA concentration in serum.**

After obtaining the serum as described in material and methods section, we determined various biochemical parameters including the concentration of MDA. As can be seen in Table 2 and Figure 13 there is an increased of MDA concentration in the serum of rats in ethanol group, this increase being statistically significant compared to the control, control + naltrexone and ethanol + naltrexone groups. Naltrexone treatment after 6 weeks of ethanol consumption is able to reverse to control levels of serum MDA concentration.

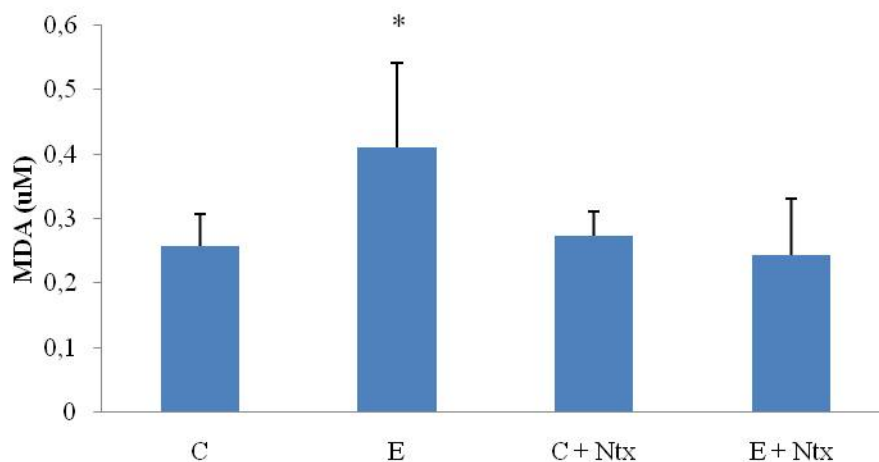


Figure 13: MDA concentration in serum. Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + Naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  compared to all groups.

#### 4.1.2 GPx activity in serum.

Figure 14 shows how the consumption of ethanol for 6 weeks significantly decreases GPx activity compared to control and ethanol + naltrexone groups. In this case the administration of naltrexone also recovered significantly GPx activity.

	MDA	GPx
Control	0,26 ± 0,05	1495 ± 188
Ethanol	0,41 ± 0,13 *	1270 ± 112 *
Control + Naltrexona	0,27 ± 0,04	1517 ± 226
Ethanol + Naltrexona	0,24 ± 0,09	1375 ± 131

Table 2: Biochemical parameters in serum. MDA concentration (uM) and GPx activity (mmol / l \* min.) \*  $p < 0.05$  compared to all groups.



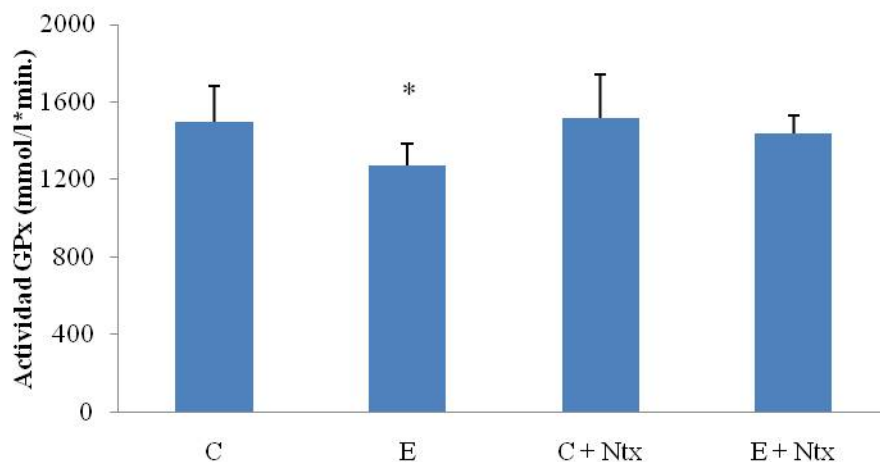


Figure 14: GPx activity in serum. Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  compared to all groups.

## 5 Study of the hippocampus.

### 5.1 Biochemical parameters.

#### 5.1.1 MDA concentration in hippocampus.

Table 3 and Figure 15 show MDA concentration in homogenates of hippocampus. It can be seen there is a statistically significant increase of MDA concentration in the ethanol group compared to control, control + naltrexone, ethanol + naltrexone groups. In the case of the hippocampus, as occurred in the plasma, treatment with naltrexone is able to reverse the significantly increased the concentration of MDA in the group of animals that consumed ethanol.

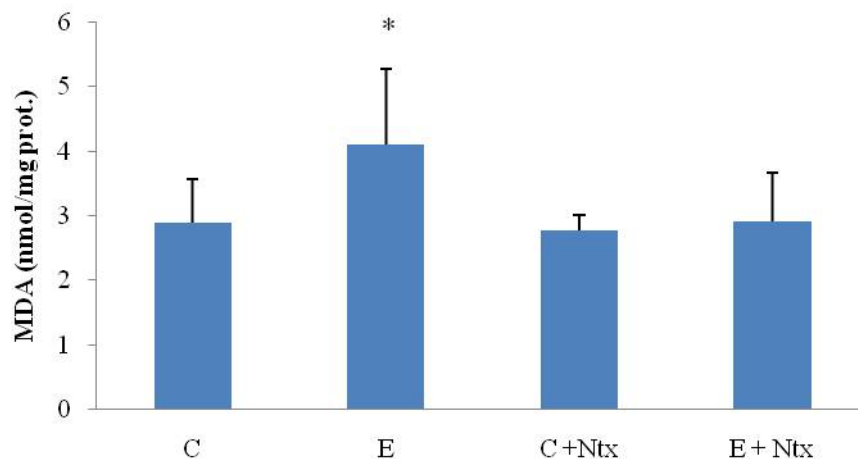


Figure 15: MDA concentration in the hippocampus. Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + Naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  compared to all groups.  $n = 8$  per group.

### 5.1.2 GPx activity in the hippocampus.

Figure 16 shows GPx activity in the hippocampal homogenate. It is observed there is a statistically significant decrease in the activity of this enzyme in the ethanol group compared to the control and control + naltrexone group. Treatment with naltrexone in the ethanol group is unable to recover the significant loss of GPx activity.

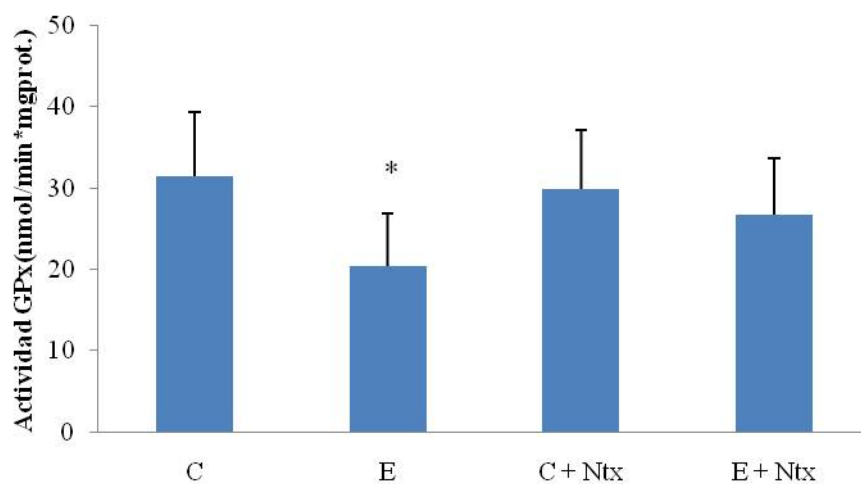


Figure 16: GPx activity in the hippocampus. Control (C), Ethanol (E), Control +naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + naltrexone (E + Ntx). \* $p < 0.05$  versus the control group and control naltrexone.  $n = 8$ .

### 5.1.3 Ratio GSH / GSSG.

Figure 17 shows the relationship between the concentration of GSH and GSSG in the hippocampal homogenate. It is observed that in the ethanol group and ethanol + naltrexone there is a decrease in the ratio GSH / GSSG. This decrease in the ratio GSH / GSSG means that there is an increase in the oxidized form of GSH, GSSG, or a decrease of GSH.

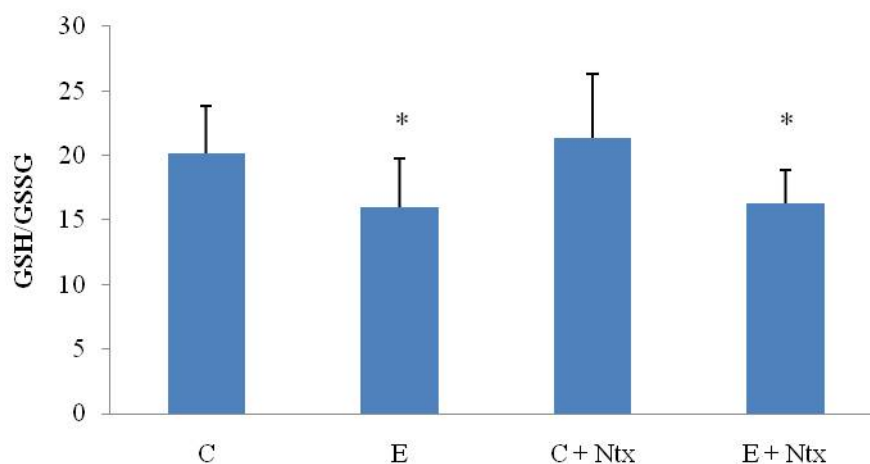


Figure 17: Ratio GSH / GSSG in the hippocampus. Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + Naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  versus the control group and control naltrexone.  $n = 8$ .

	MDA	GPx	GSH/GSSG
Control	2,89 ± 0,68	31,49 ± 7,79	20,19 ± 3,6
Ethanol	4,10 ± 1,17 *	20,45 ± 6,45 **	15,95 ± 3,8**
Control + Naltrexona	2,77 ± 0,23	29,85 ± 7,23	21,33 ± 4,9
Ethanol + Naltrexona	2,91 ± 0,75	26,68 ± 7,01	16,29 ± 2,6**

**Table 3: Biochemical parameters in the hippocampus.** MDA concentration (mmol / mg protein). GPx activity (nmol / mg protein x min.) and GSH / GSSG ratio. \*  $p < 0.05$  compared to all groups. \*\*  $p < 0.05$  versus the control group and Control+ Naltrexone.  $n = 8$  per group.

## 5.2 Study of pCREB / CREB and BDNF proteins in the hippocampus.

The determination of CREB and CREB phosphorylated form (pCREB), was performed by Western Blot as described in Material and Methods.

In Figure 18 we can observe that in the ethanol group there is a statistically significant increase in phosphorylation of CREB in the hippocampus, which is the active form of this protein. The administration of naltrexone, an antagonist of  $\mu$ -opioid receptors, is able to inhibit this phosphorylation. There are no changes in CREB, as described by others authors (Pandey et al., 2003).

Because there was an increased phosphorylation of CREB, we also to study the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is one of the proteins targeted by pCREB. As shown in Figure 18, there is an increase of BDNF in the ethanol group, this increase correlates with the increase in pCREB. In this case, naltrexone also inhibited the increase in BDNF.

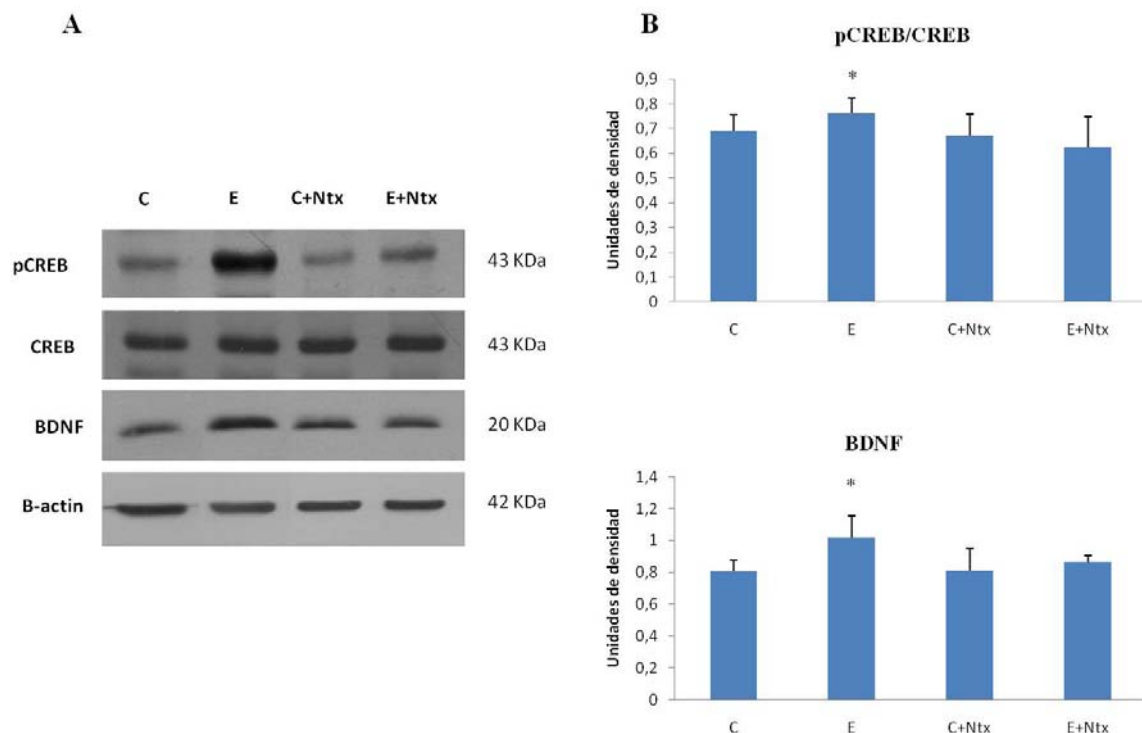


Figure 18: **A).** Western blot of pCREB protein, CREB and BDNF. Actin as control load. **B)** Graphical quantitation of Westerns, Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  compared to all groups.  $n = 8$  per group.

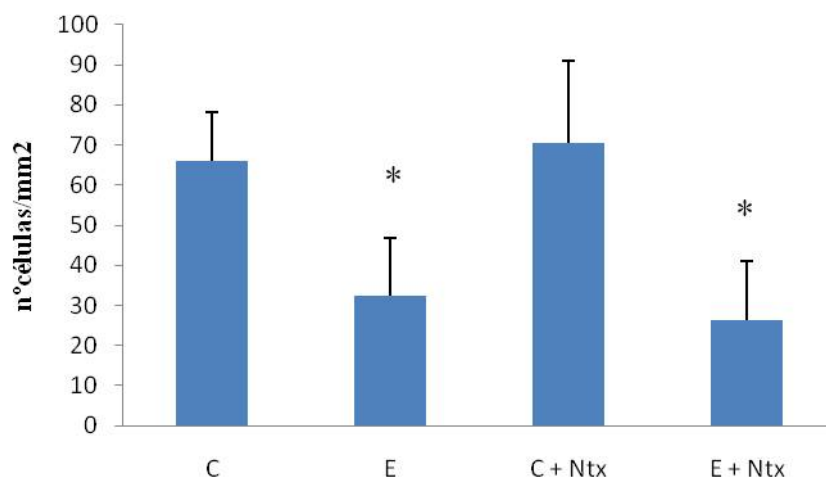
### 5.3 Immunohistochemical study.

#### 5.3.1 BrdU.

In the present work as described in material and methods, we analyzed the effect of ethanol on cell proliferation specifically in the survival and studied if naltrexone is able to improve this parameter.

We studied the expression of BrdU in the hippocampus of the rats in all groups at the end of the experiment and showed a basal expression localized in the dentate gyrus.

As shown in Figure 19 and Figure 20, after 6 weeks of consumption of ethanol there is a significant decrease in cell survival in ethanol group, and in this case, naltrexone has no protective role since there is also a significant decrease in the number of BrdU positive cells in the Ethanol + Naltrexone group compared to Control and Control+ Naltrexone groups.



**Figure 19: Expression of BrdU (N° cel/mm<sup>2</sup>).** Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + Naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  versus Control group and Control Naltrexone.  $n = 8$ .

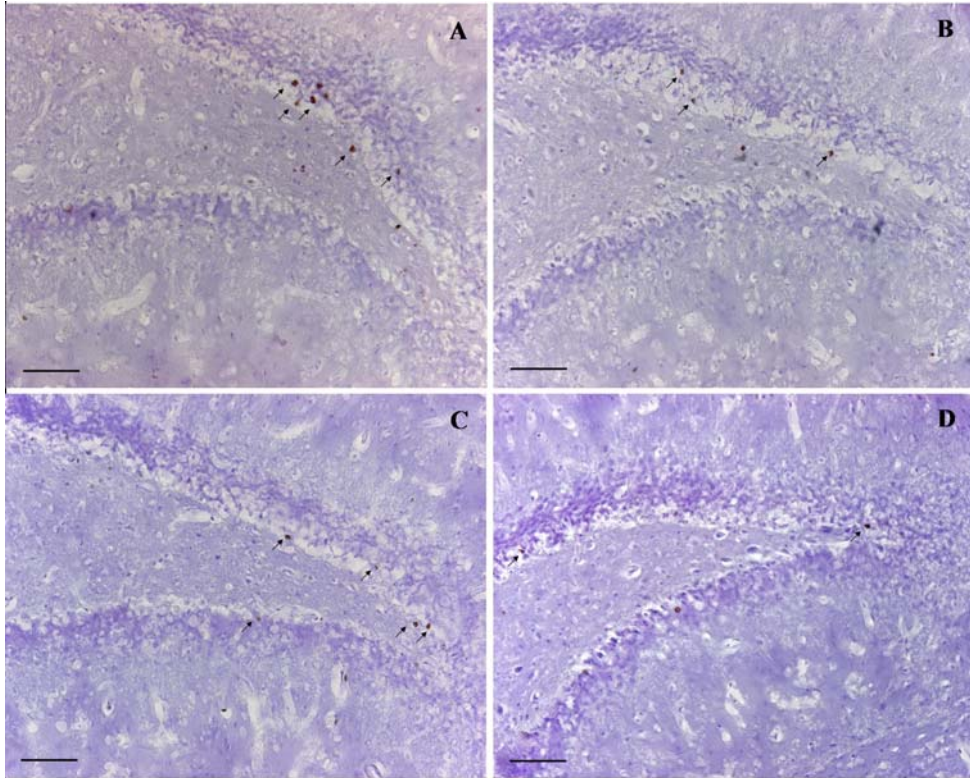


Figure 20: Expression of BrdU (N° cel/mm<sup>2</sup>) in the hippocampus (20x), bar = 50µm.

A). Contro, B) Ethanol, C) Control + Naltrexone and D) Ethanol + Natrexona.

### 5.3.2 Doublecortin.

With doublecortin immunohistochemical study we wanted to study proliferation of new neurons, and again consider whether naltrexone exerts a role in the proliferation of newly formed neurons.

DCX labeled cells were observed in the subgranular layer of the dentate gyrus and their processes extending to the outside, as seen in the detail of Figure 21. Ethanol produces a decrease in the number of new neurons in the dentate gyrus as it is shown in Figure 22, the decline is significant to compared all study groups. In this case naltrexone does improve the proliferation of new neurons.



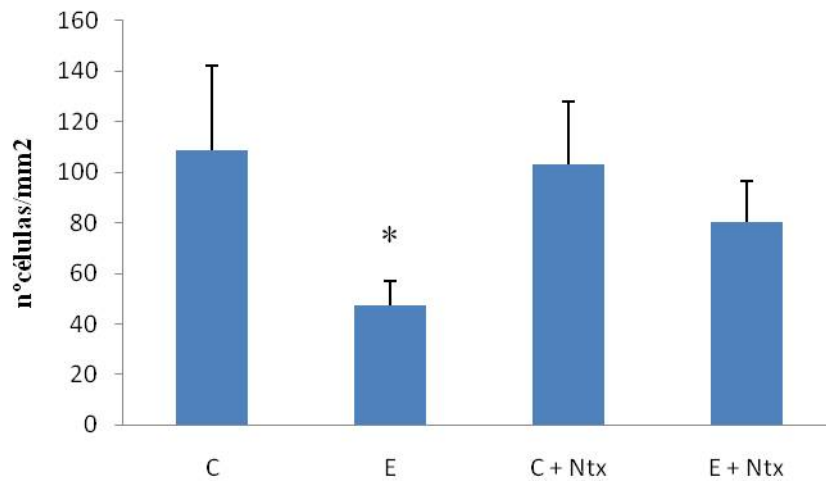


Figure 21: Expression of dolecortina ( $N^{\circ}$  cel/ $mm^2$ ). Control (C), Ethanol (E), Control + Naltrexone (C + Ntx) and Ethanol + Naltrexone (E + Ntx). \*  $p < 0.05$  compared to all groups.  $n = 8$ .

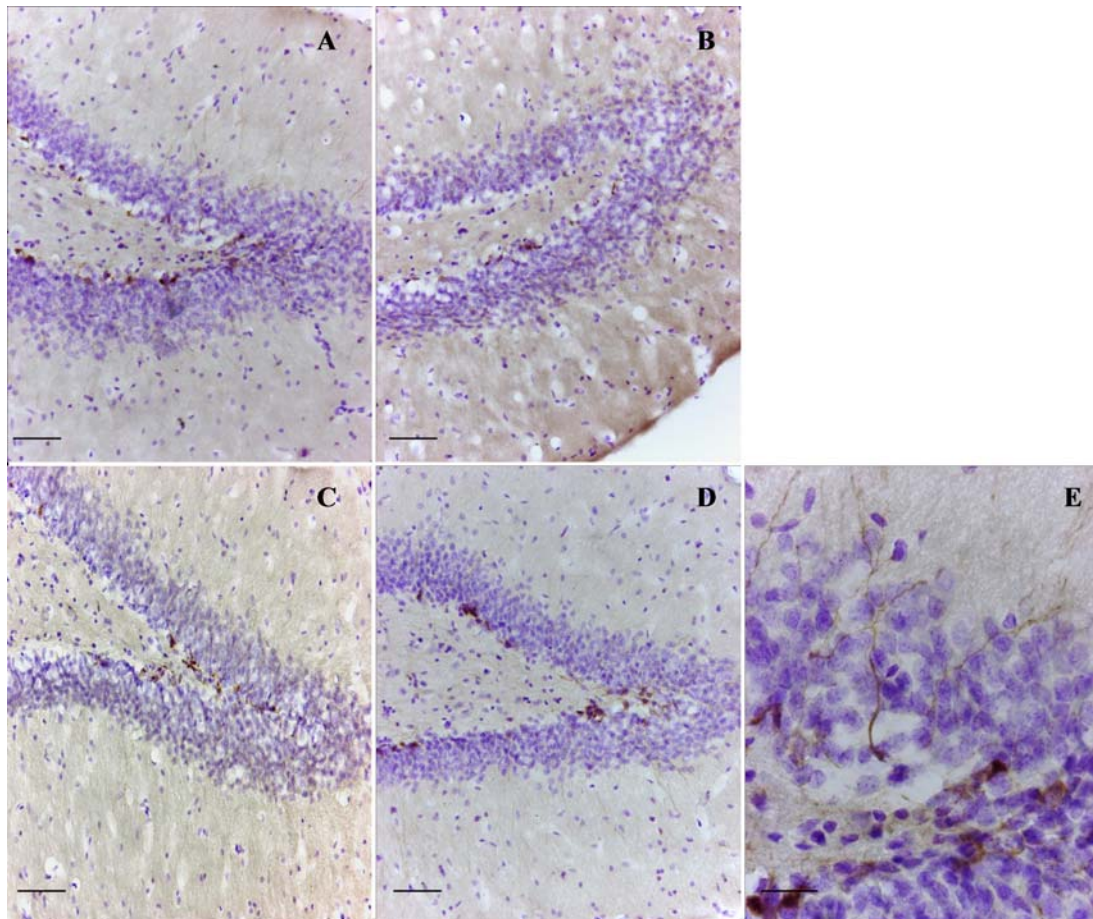


Figure 22: DCX expression ( $N^{\circ}$  cel/ $mm^2$ ) in the hippocampus (20x), bar =  $50\mu$ . A). Contro, B) Ethanol, C) Control + Naltrexone D) Ethanol + Natrexona. E). Details of the DCX staining, magnification (60x) of the control group photo. Barr =  $20\mu$ .

## 6. Study of the effects of ethanol on brain mitochondria.

### 6.1 Concentration of free cholesterol.

We determined the concentration of free cholesterol in both brain homogenates and in mitochondrial fraction of rat brain in control and ethanol groups. As shown in Figure 23, there is no variation in free cholesterol concentration in the brain homogenates from control and ethanol group. In contrast in mitochondrial fraction there is a statistically significant increase in cholesterol in the ethanol group compared to control (Figure 24).

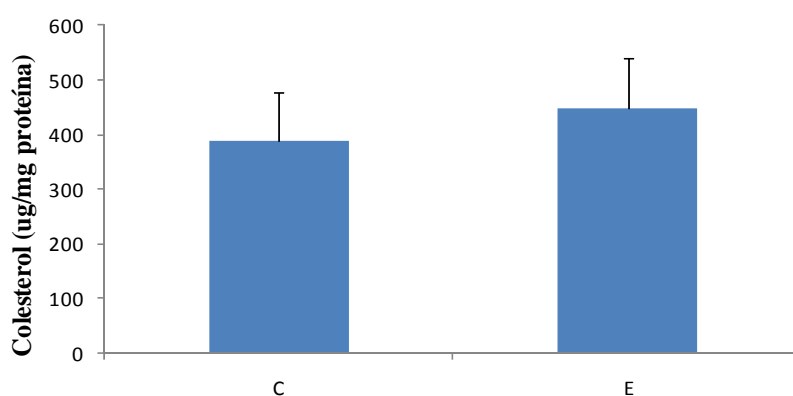


Figure 23: Cholesterol levels in brain homogenate in the Control group (C) and Ethanol group (E).

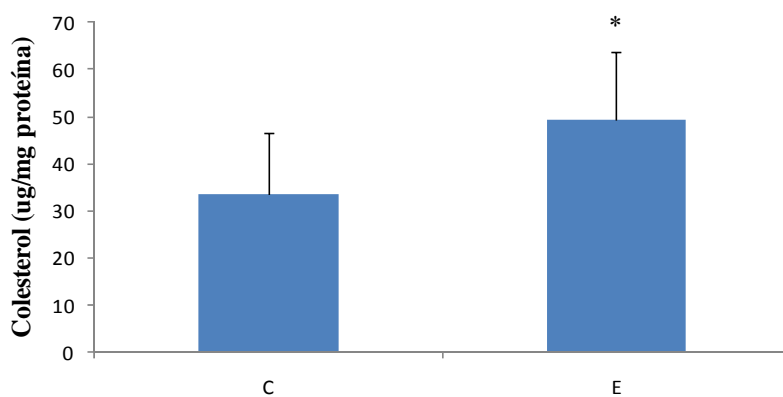


Figure 24: Concentration of cholesterol in brain mitochondria in the Control group (C) and Ethanol (E). \*  $p < 0.05$  versus control group.



## 6.2 Concentration of glutathione.

As shown in Figures 25 and 26, there is no change in GSH concentration and GSSG concentration in the brain homogenate, whereas when measuring mitochondrial GSH, we observe a significant decrease in the ethanol group, and this correlates with the significant increase in mitochondrial GSSG concentration (Figures 27 and 28).

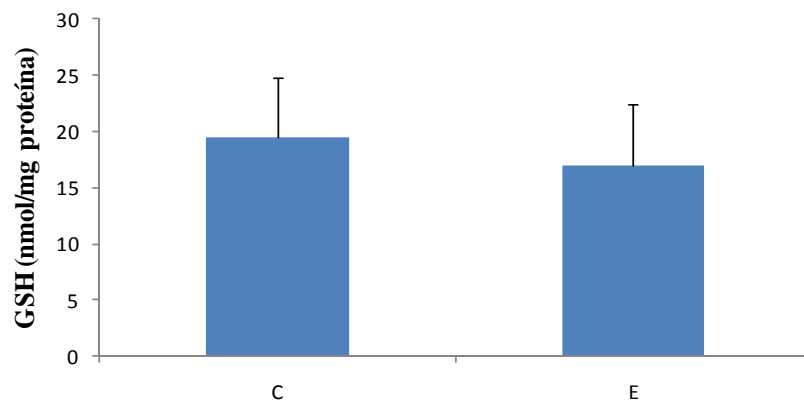


Figure 25: GSH concentration in brain homogenate in the Control (C) and Ethanol group (E).

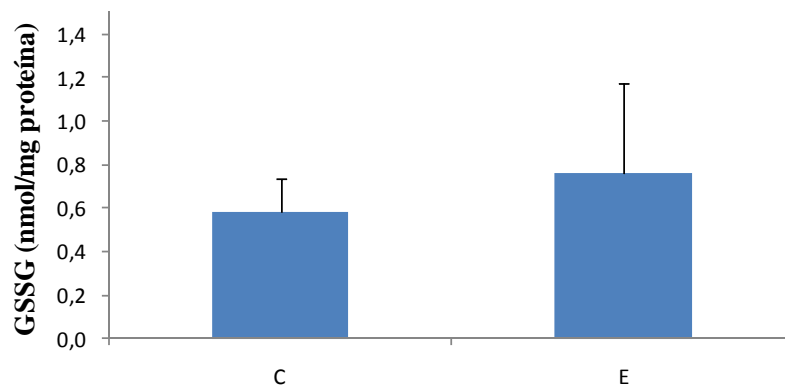


Figure 26: Concentration of GSSG in brain homogenate in the Control group (C) and ethanol (E).

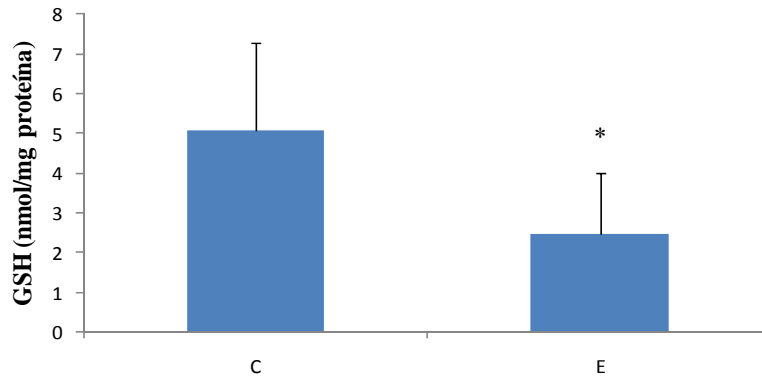


Figure 27: GSH concentration in brain mitochondria in the Control (C) and Ethanol group (E).

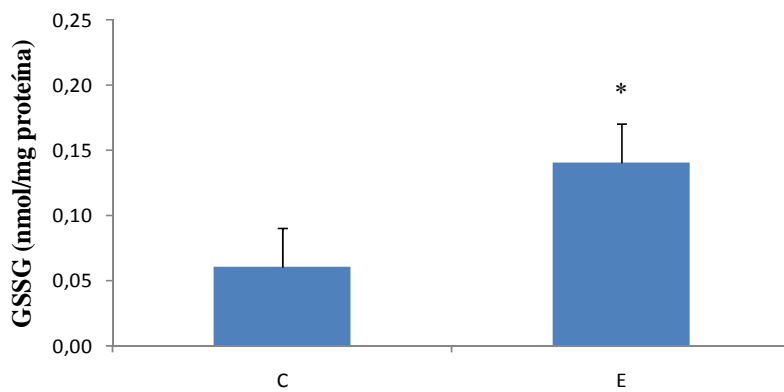


Figure 28: Concentration of GSSG in brain mitochondria of the Control group (C) and ethanol (E).

### 6.3 Release of proapoptotic proteins.

In the western blot in Figure 29 it can be seen that ethanol causes the release of both cytochrome c and Smac/Diablo, when it is exposed to proapoptotic stimuli (atractyloside) as described in the Material and methods.

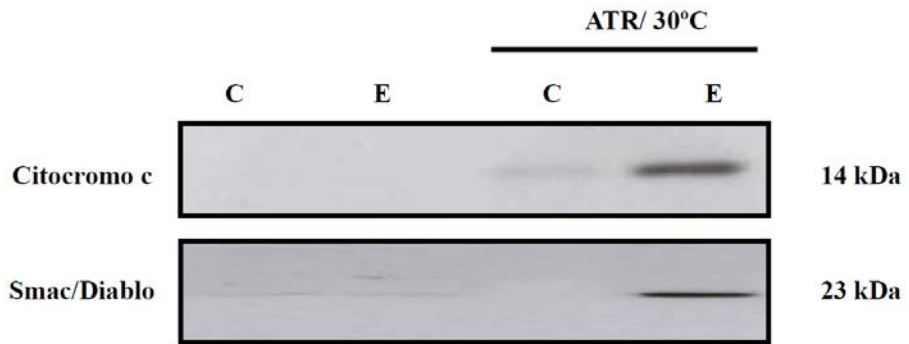


Figure 29: Release of proapoptotic proteins from mitochondria Control (C) and Ethanol (E) without and with exposure to atractyloside (ATR).



## V. DISCUSSION

### 1. Effect of chronic ethanol administration on oxidative stress in rat brain.

Ethanol is a toxic substance greatly widespread in our environment, it can exert its toxic action either by direct effect by generating free radicals or through their metabolites. Free radicals have been linked as one of the main factors involved in the alterations resulting from chronic consumption in both the central and peripheral nervous system (Bosch-Morell et al., 1998).

Free radicals may directly or indirectly affect several cellular and physiological mechanisms, they may lead to alterations in vital macromolecules to living cells, including DNA (causing mutations) or membrane lipids (causing their peroxidation). It has been shown that chronic alcohol consumption leads to an increase in lipid peroxidation products and a decrease in antioxidant factors such as glutathione (GSH) and derived enzymes (Fernandez-Checa, 2003). Alcohol consumption has also been associated with damage to mitochondria, resulting in a decrease in the production of ATP (Koch et al., 2004).

Several studies (Tabuchi et al., 1995; Kono et al., 2001) have shown that the use of antioxidants can prevent liver and the gastric mucosa damage caused by alcohol. Antioxidants have also been used in central nervous system to reduce ethanol-induced neuropathy (Bosch-Morell et al., 1998; Avino et al., 2002; Johnsen-Soriano et al., 2007b; Sancho-Tello et al., 2008).

In our experimental model the animals were fed with a well balanced diet, ensuring that the nutritional and caloric intake in all groups were homogeneous. We could affirm that a vitamin deficiency that has traditionally been attributed a fundamental role in the pathology of neuropathy associated with alcoholism, have not influenced our results, or it has had any effect, and eventually to the same extent in all groups. A nutritional deficiency in a trace mineral that is part of antioxidant enzymes such as Cu, Zn and Se, or any amino acid necessary for the synthesis of GSH, such as methionine and cysteine, would manifest as a decrease in the concentration of GSH in all groups, either by its excessive consumption due to the accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, or by the limitation of its synthesis.

The present study shows that chronic ethanol consumption causes increased production of free radicals and lipid peroxidation products (MDA) and the decrease of

endogenous antioxidant levels (GSH / GSSG ratio) and GPx activity. These are evidences supporting the role of oxidative stress in ethanol-induced damage on the hippocampus (Figures 15, 16 and Table 3 for results). These results are consistent with previous results describing that chronically administered ethanol induces significant changes in the hippocampus, cerebellum, cortex, and also in the retina of rats. In all these tissues ethanol reduces the content of GSH and increases lipid peroxidation (Calabrese et al., 2002; Johnsen-Soriano et al., 2007b; Sancho-Tello et al., 2008).

### **1.1 Effect of alcohol on brain mitochondria.**

In chronic abuse of ethanol, a variety of impairments of brain function, such as visual, motor, and memory dysfunction, appear as typical symptoms. Ethanol exerts these effects by interacting with neurotransmitter systems, cell membranes and receptors, thus modifying key functions of the CNS (Herrera et al., 2003; Sancho-Tello et al., 2008).

Although the molecular and cellular mechanisms that account for these effects have not been fully identified, several studies have reported that the pharmacological mechanisms that mediate ethanol effects result in the production of oxidative stress (Sun et al., 2001). This oxidative stress has been reported to produce a significant decrease of antioxidant enzymes and altered glutathione homeostasis in the brain accompanied by severe impairment of hippocampal dependent functions (e.g. LTP, water maze test performance) (Johnsen-Soriano et al., 2007a). Furthermore, in the present work we demonstrate that there is a decrease in the activity of the enzyme glutathione peroxidase in the hippocampus of rats that had consumed ethanol chronically, compared to those who consumed control diet, as well as a decrease in the GSH / GSSG ratio, all that accompanied by an increase in MDA.

Other groups have described a decrease in GSH concentration in the brain of alcoholic rats (Calabrese et al., 2002; Agar et al., 2003). In contrast, herein we show that six weeks of chronic ethanol feeding results only in a modest fall, if any, of brain cellular GSH and no significant modification of GSSG content (Figure 17). Our results could be explained by the highly differing sensitivity to ethanol within specific neuron populations (Maffi et al., 2008). Moreover, mitochondrial GSH is significantly reduced in alcoholic animals (Figure. 27), and this might be a highly relevant factor since mitochondrial GSH plays a crucial role in cell viability (Meredith & Reed, 1983;

Romero & Sies, 1984; Romero et al., 1984) and complete depletion of mitochondrial GSH is followed by gradual loss of cell viability (Meredith & Reed, 1982; Romero & Sies, 1984).

Mitochondria from alcohol-fed rat liver have higher cholesterol levels which result in a defect of the mitochondrial GSH transport, due to the effect of increased membrane microviscosity on the kinetic properties of the GSH carrier; this impairment is finally translated in a depletion of mitochondrial GSH (Colell et al., 1997). Considering that brain tissue is the cholesterol-richest organ, we have also studied cholesterol levels both, in total brain homogenate and in mitochondrial fraction, detecting an increased deposition of cholesterol into mitochondria after ethanol treatment (Figure 24 from Results). Other studies have shown that cholesterol enrichment of isolated rat liver mitochondria impaired the adenine nucleotide translocator (ANT) mediated mitochondrial permeability transition pore (MPTP) with the subsequent release of mitochondrial proapoptotic proteins due to the decreased membrane fluidity (Colell et al., 2003). MPTP is a multiprotein complex involved in the mitochondrial regulating mechanisms of cell death, and can be influenced by several factors including reactive oxygen species by targeting specific thiol residues of certain MPTP components, e.g. ANT (Costantini et al., 2000; Vieira et al., 2001).

Mitochondrial GSSG levels are increased in alcoholic brain mitochondria (Figure 28) confirming the oxidative burden induced by ethanol consumption. In preliminary studies (data not shown) we could observe an increase in lipid peroxidation product formation in brain mitochondrial fraction upon incubation with ethanol or acetaldehyde. Moreover, a recent report (Haorah et al., 2005) found that alcohol metabolizing enzymes (alcohol dehydrogenase and CYP2E1) are active in human neurons. These results may indicate that both ethanol and its metabolites can induce brain oxidative stress.

To test whether these mitochondria from alcoholic brain have an increased susceptibility to apoptotic stimuli, e.g. atractyloside, we studied by western blot techniques, the release of the apoptogenic proteins cytochrome c and smac/Diablo. Atractyloside triggered a bigger release of cytochrome c and Smac/Diablo from alcoholic mitochondria than from control ones. Our findings are in agreement with others that have described the, *in vitro*, induction of apoptotic markers in ethanol-exposed fetal neurons with low GSH content (Ramachandran et al., 2003b; Maffi et al.,

2008), and that ethanol enhances apoptosis in neurons that are undergoing apoptotic cell death triggered by other factors (Krzyzanski et al., 2007).

### **1.2 Naltrexone in the treatment of alcoholism. Antioxidant properties?**

Ethanol administration induces the release of endogenous opioids in both, experimental animals (Marinelli et al., 2003; Marinelli et al., 2005) and humans (Dai et al., 2002). In contrast, the administration of opioid antagonists such as naltrexone has been shown to decrease the positive subjective effects and the behavior changes associated with ethanol consumption. For example, in alcohol-dependent patients, naltrexone decreased ethanol consumption and the ability of alcohol to cause uncontrolled high intakes (Anton et al., 2004; Feinn & Kranzler, 2005). Several studies have concluded that in social drinkers, naltrexone may decrease the subjective stimulant effects of alcohol and the urge to drink (Peterson et al., 2006; Setiawan et al., 2011). Naltrexone accompanied by a psychotherapeutic approach is one of the drugs most used for alcohol detoxification.

At present, different actions of naltrexone are being studied. Several studies suggest that endogenous opioids modulate oxidative stress in different tissues and it can affect survival and proliferation (Payabvash et al., 2007). In an experimental study of chronic cholestasis, it has been observed that chronic administration of naltrexone significantly improved levels of GSH in rat liver. The recovery of the concentration of GSH by administration of naltrexone was dose-dependent (Payabvash et al., 2007); the authors describe in this paper that naltrexone exerts its protective effect by blocking opioid receptors. In another study the same group inhibit morphine-induced apoptosis both by the administration of naltrexone or N-acetyl-cysteine (Payabvash et al., 2006), and suggest that reducing oxidative stress in the liver is presumably the reason of the reduction of apoptosis in hepatocytes.

Opioid peptides are recognized as modulators of the release of ROS in different types of inflammatory cells (Sobocanec et al., 2006). Naloxone inhibits the release of superoxide anion in human neutrophils in a dose-dependent manner (Simpkins et al., 1985). In addition, naltrexone has anti-inflammatory effect through the blockade of opioid receptors. It has been observed that naltrexone significantly reduces neutrophil infiltration in the liver and reduces levels of TNF- $\alpha$  in a model of inflammation induced by LPS (Lin et al., 2005).



Pretreatment with naltrexone significantly reduced the circulatory failure and liver dysfunction in sepsis induced by LPS, these effects are associated with reduced levels of TNF- $\alpha$ , and a decrease in the formation of superoxide anion (Lin et al., 2005). In the study by Lin et al. naltrexone was administered before LPS, in a prevention manner. In our study we administered naltrexone as a treatment after 4 weeks of ethanol consumption, and we noted that naltrexone is able to normalize the concentration of MDA both in serum and in the hippocampus, in addition treatment with naltrexone recovers GPx enzyme activity to values similar to control in serum samples.

CC Wang et al., noted that naltrexone administered 30 minutes after treating rats with LPS, was able to reduce plasma concentrations of ALT and AST enzymes indicative of liver damage after 12 hours of treatment with LPS (Wang et al., 2008). This study also reported a reduction of superoxide anion formation in the liver of rats that were given naltrexone.

On the other side Agrawal et al. suggested that naltrexone administered at low doses (3-4.5 mg / day) may help treatment of multiple sclerosis. His hypothesis is based on the fact that in multiple sclerosis the peroxynitrite produced by astrocytes and microglia inhibit the transport of glutamate into the synaptic cleft, resulting in excitatory neurotoxicity by glutamate, so they hypothesize that low-dose naltrexone works by reducing the nitric oxide synthase activity. This causes a reduction in the formation of peroxynitrite, which prevents the inhibition of glutamate transport (Agrawal, 2005). In our study, we observed that ethanol causes an increase in the production of MDA, a lipid peroxidation product, and that the administration of naltrexone decreased MDA concentration to control values in both hippocampus and serum. Chronic ethanol consumption increases the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), which could change the amount of NO produced by different brain areas (Chandler et al., 1997), so according to this hypothesis we could explain the MDA reduction observed in the Ethanol plus naltrexone group. In this sense, naltrexone could reduce the activity of nitric oxide synthase, thereby reducing NO production, preventing the possible generation of peroxynitrite, responsible of lipid peroxidation (Radi et al., 1991).

We also determined that naltrexone has antioxidant capacity, because the oxidation of ABTS to ABTS<sup>+</sup> by metmyoglobin concentration decreases with naltrexone (Figure 12 in Results).

Radicals may directly or indirectly affect several cellular and physiological mechanisms, may lead to alterations in vital macromolecules to living cells, including

DNA (causing mutations) or membrane lipids (causing their peroxidation). Several experiments have shown that chronic alcohol consumption leads to an increase in lipid peroxidation products and a decreased in antioxidant factors such as glutathione (GSH) and related enzymes (Fernandez-Checa et al., 1998a; Schlorff et al., 1999). Also alcohol consumption has been associated with damage to mitochondria, resulting in a decrease in the production of ATP (Koch et al., 2004).

In this work we have demonstrated that the administration of naltrexone after 4 weeks of alcohol consumption reduces oxidative stress by decreasing lipid peroxidation and that there is a partial recovery of the values of GPx activity in the hippocampus. For all these reasons, naltrexone that is used in the treatment of addiction because of its properties as opioid antagonists has another beneficial action as an antioxidant, and it may improve the situation of oxidative stress that occurs in chronic alcoholism.

## **2. Ethanol modulates the expression of pCREB and BDNF.**

Drugs of abuse can have profound long-term effects on the central nervous system by modulating signaling pathways that control gene expression. A notable point in the expression of genes is the regulation of transcription. An important transcription factor is the cAMP response element binding (CREB). CREB helps to modulate synaptic plasticity, and we know that it plays an important role in the mechanisms that underlie learning and memory.

CREB is a point of convergence in the action of different neurotransmitters and / or modulators in several neurocircuits at the brain, including hippocampus, amygdala and ventral striatum (Nac). The cAMP signaling pathway is one of the main targets on which ethanol and other drugs act in the CNS.

It is known that CREB is not distributed in the same way in different areas of the brain. Its expression is significantly increased in the NAc compared to the expression of CREB in the ATV, while no differences in the hippocampus and cortex are observed (Walters et al., 2003). At the same time there are discrepancies in the literature on the effect of ethanol administration on the expression of CREB and pCREB. These differences are due in most cases by the different methodological approaches used in different studies, the different animal species used, if alcohol consumption was chronic or acute, the different form of administration and the brain area under study.

Hoffman P.L. et al. observed increased CREB activity in hippocampus and cortex after acute treatment of ethanol, whereas S. Bison et al. observed that acute administration of ethanol produced a decrease in pCREB in these same areas and only after 72 hours of withdrawal they observed an increase in phosphorylation of CREB (Bison & Crews, 2003).

Pandey S.C. found that chronic ethanol consumption (15 days of alcohol diet) did not affect the activation of CREB, but after 24 hours of withdrawal there was a decrease in pCREB in the central and medial amygdala (Pandey et al., 2003). In our study the administration of ethanol is much longer (6 weeks) plus 24 hours of withdrawal before killing the rat, we observed that in the hippocampus of the ethanol group there is a significantly increased expression of pCREB in the same way that SC Pandey observed an increase in pCREB in the cingulate after 24 hours of abstinence, having only a decrease in the expression of pCREB in the ethanol group without abstinence.

Recently it has been postulated that the transcription factor CREB functions as a junction between the reward of the drug and the response to stress. CREB is regulated by alcohol in both acute and chronic consumption. Similarly, stress and the subsequent activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is associated with an increase in pCREB in various brain areas after different stress situations such as shock, successive detentions, and forced swimming test (Stanciu et al., 2001; Bilang-Bleuel et al., 2002). In addition Kreibich A.S. et al. have shown that repeated exposure to forced swimming test before the first day of drug administration, increase the conditioning place preference for the drug. In this study, the drug administered was cocaine. This model has important clinical implications, since one might think that the stress is the critical factor underlying the vulnerability to drugs of abuse (Kreibich et al., 2009). In turn, this group demonstrated that CREB was necessary for the increased reward to cocaine induced by stress and that CREB mutant mice have not had place preference. Then they observed an increase in pCREB in various brain areas after a series of forced swimming. The brain regions where this increase in pCREB was observed are areas closely related to the brain circuitry of addiction, such as NAc, amygdala and lateral septum.

In this work we observed that in the ethanol group, which has had 24 hours of abstinence, there is an increase in phosphorylation of CREB. Perhaps this increase is in due to the increase in stress.

A large number of clinical therapies show that the opioid antagonist drug naltrexone is a very effective adjunct to reduce relapse in alcoholics (O'Malley et al., 1992; Volpicelli et al., 1992; O'Malley, 1995). There are many evidences showing that the stimulation of reward for ethanol increases the activity of endogenous opioid system (Gianoulakis & de Waele, 1994; Gianoulakis, 1996; Herz, 1997 49). It has been hypothesized that ethanol reward is mediated, at least in part by an increase in opioid activity (Koob, 1992; Self & Nestler, 1995).

It has been reported that on many occasions after chronic administration of the drug, the withdrawal may cause a stress situation. However, in the ethanol plus naltrexone group, we report that there is not an increase in pCREB. It is possible that naltrexone as an opioid antagonist blocks opioid receptors and avoid activating the stimulation of the reward, thereby inhibiting the stress caused by the search of the drug.

A BDNF dysregulation has been linked to the development of psychiatric illness, including schizophrenia, depression, anxiety and addiction to alcohol (Angelucci et al., 2005; Davis, 2008).

As occurred with the expression and activation of CREB, in the literature there are many discrepancies when analyzing BDNF and its relation to the use of different drugs. There are studies which have found that chronic treatment with ethanol causes a decrease in the expression of BDNF in the hippocampus and cortex of rats (MacLennan et al., 1995; Pandey et al., 1999). However, McGough et al. describe that the expression of BDNF was increased in the dorsal striatum of mice after acute consumption of alcohol (self-administration). In addition, they have found that a decrease in the levels of BDNF leads to an increase in ethanol consumption while increasing BDNF attenuates the effects of consumption in mice. These results suggest that BDNF signaling pathway may serve as homeostatic path involved in the regulation of alcohol addiction (McGough et al., 2004).

On the other hand, BDNF is expressed in the dopaminergic mesocorticolimbic pathway originated in the ATV and Nac also known as the reward pathway. Recent studies implicate neurotrophins as mediators in the processes of reward and addiction. Psychostimulant drugs such as cocaine, amphetamines or alcohol, both administered by injection or by self-administration, increased mRNA expression of BDNF and the levels of this protein in the paraventricular hypothalamus and mesolimbic different areas, cingulate cortex and striatum (Fumagalli et al., 2007; Logrip et al., 2009). In contrast, the levels of BDNF in the cortex are reduced after long periods of self-administration of

ethanol (Logrip et al., 2009). In addition, injection or overexpression of BDNF in the ATV consumption (Graham et al., 2007) and response to psychostimulant drugs, as reflected by an increase in locomotor response and conditioned place preference (Bahi et al., 2008).

It is also thought that the increase in BDNF levels facilitates the transition from the acute response reward to a state of dependence, characteristic of addiction. Furthermore injection or overexpression of BDNF in the reward pathway sensitizes dopaminergic response to drugs (Vargas-Perez et al., 2009) and facilitates drug seeking behaviour (Lu et al., 2004) and relapse (Graham et al., 2007), while the search for cocaine can be decreased by BDNF when injected into the medial prefrontal cortex (Berglind et al., 2007). It is known that the dynamic regulation of the synthesis and release of BDNF in NAc during cocaine use contributes to the development and maintenance of cocaine addiction (Graham et al., 2007).

We can conclude that the development of drug addiction is partly mediated by alterations in BDNF signaling.

Pardon M.C. observed an increase in protein levels of BDNF in the hippocampus after 1 hour of exposure to a new environment (Pardon et al., 2005). Furthermore, restraint stress induces a rapid increase in levels of BDNF mRNA and protein levels in the hypothalamus and hippocampus of rat, but this effect is observed up to an hour after the onset of stress, then levels of BDNF mRNA and both its protein decrease when the duration of the adverse experience increases (Marmigere et al., 2003). This suggests that induction of BDNF is part of the normal response to a stressful situation, possibly to prevent adverse outcomes. BDNF is a neurotrophic factor regulated by CREB activation, so if a stress promotes the phosphorylation of CREB, it is easy to assume that there will be an increase in BDNF, which is the situation we have in our work, where the ethanol group has increased BDNF in the hippocampus.

Vargas-Perez et al. suggest that increased levels of BDNF in the ATV could induce a change in the emotional state dependent on the drug in rats due to the effects dependent of BDNF on GABAergic neurons (Vargas-Perez et al., 2009).

It is therefore of particular interest that in this work we observe that the administration of naltrexone inhibit the increase in both pCREB and BDNF. It is known that naltrexone exerts its action by decreasing the circuits that activate the reinforcement associated with drug consumption, thus reducing their consumption, so we might think that both pCREB and BDNF are involved in these circuits.

### **3. Effect of alcohol on neurogenesis.**

Neurogenesis, considered as a developmental process that involves proliferation, migration, survival and differentiation of stem cells in central nervous system to neurons (Palmer et al., 1997), may be affected by numerous factors. Some of these factors include hormones, neurotransmitters, brain damage and even an enriched environment. Given this background it seems clear that the study of neurogenesis in the hippocampus may be crucial in our model of alcoholism.

At present the fact that ethanol affects neurogenesis is fully demonstrated, there are plenty of jobs that studied the effect of ethanol on neurogenesis in the hippocampus. These studies include embryonic research on fetal alcoholic syndrome (Crews et al., 2003), research in the hippocampus of adolescent rats (Crews et al., 2006; Morris et al., 2010), and studies in adults after acute alcohol consumption, and chronic alcohol consumption (Herrera et al., 2003; Richardson et al., 2009). In this study we observed that the administration of ethanol for 6 weeks reduces neurogenesis, with a decrease in cell survival in ethanol group compared to the control group, confirming the above mentioned studies.

The decrease in the number of newborn cells in the dentate gyrus of rats exposed to alcohol may be due to an alteration of the proliferation of stem cells in the hippocampus, a decreased survival or both. Previous work in our research group found that ethanol consumption affects the survival, but not proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus. The control and ethanol group had the same number of BrdU positive cells in the dentate gyrus an hour after the last injection of BrdU, a fact which states that cell proliferation is not affected. However, after 2 weeks of last injection of BrdU, there was a decrease of the BrdU positive cells to levels observed at 6 weeks after exposure to ethanol (Herrera et al., 2003), so that the survival of new cells is affected by ethanol consumption. In addition, the dentate gyrus of animals exposed to ethanol showed a marked increase in cell death, mainly in the basal layers of the dentate gyrus, where the majority of newborn cells are located. These facts suggest that ethanol exposure affects survival especially in the first two weeks and that proliferation was not affected (Herrera et al., 2003). All this may explain the fact that in the present study, we observed that administration of naltrexone did not improve cell survival in hippocampal dentate gyrus, since we injected BrdU during the first 10 days of dietary administration of alcohol, and naltrexone is given 4 weeks later, so as noted by Herrera et al. in this

time interval the number of BrdU + cells decreased by 70% compared to control. So in future work naltrexone should be administered prior to this decrease in survival to determine whether naltrexone has a protective role in cell survival.

Doublecortin is expressed throughout the subgranular zone with dendrites extending outside the molecular layer. As an endogenous marker, doublecortin can validate the inhibitory effect on neurogenesis observed with BrdU labeling.

In this work we observed that rats of the alcohol group have a decrease of DCX respect to the control group. He and colleagues also found that alcoholic liquid diet reduces DCX immunoreactivity after 2 and 4 weeks of consumption (He et al., 2005). The development of dendritic processes is related to the maturity of the neuroblasts. DCX can be seen in the branching processes extending into the molecular layer of the dentate gyrus, 4 weeks of exposure to ethanol decreased by 50% the number of nodes and endings on dendrites. The length of apical dendrites is also reduced when compared with the control group. These data suggest that chronic ethanol consumption decreases the growth of dendrites of newly formed neurons leading to a deficit in the maturation of dentate gyrus of the hippocampus (He et al., 2005).

Alcohol reduces the formation of new neurons, but cells that survive the treatment of alcohol continue to differentiate mainly into neurons, and the ratio of differentiation is similar in the control group. So although the differentiation is not affected by alcohol the neurogenesis is diminished (He et al., 2005).

The novelty of this work is to observe how naltrexone is able to protect the newly formed cells that are destined to become neurons. In rats, ethanol has been administered with naltrexone for two weeks after 4 weeks of ethanol consumption, there is a recovery of staining of DCX to values close to the control groups.





## VI. CONCLUDING REMARKS

1. The animal model of chronic ethanol consumption induces oxidative stress in the rat brain (measured as changes in malondialdehyde and glutathione concentrations and glutathione peroxidase activity), as well as changes in other signaling pathways (CREB, pCREB and BDNF).
2. Chronic ethanol consumption causes a decrease in mitochondrial GSH while it increases cholesterol levels in the mitochondria, and these alterations could be the reason why the brain mitochondria of animals that have consumed ethanol are more susceptible to apoptotic stimuli.
3. Chronic ethanol consumption decreases neurogenesis in the rat hippocampus, affecting the survival of newly formed neurons.
4. Therapeutic administration of Naltrexone (starting after 4 weeks of chronic ethanol use and during the next 2 weeks along with alcohol) restores the biochemical parameters mentioned to control values, except the GSH / GSSG ratio in the rat hippocampus.
5. Naltrexone treatment restores the number of doublecortine labeled cells in this model of chronic alcoholism, indicating that naltrexone may have protective effect on newly formed neurons.



## **VII.- BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Agar E., Demir S., Amanvermez R., Bosnak M., Ayyildiz M. and Celik C. (2003) The effects of ethanol consumption on the lipid peroxidation and glutathione levels in the right and left brains of rats. *Int J Neurosci* 113:1643-1652.
- Agartz I., Momenan R., Rawlings R.R., Kerich M.J. and Hommer D.W. (1999) Hippocampal volume in patients with alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 56:356-363.
- Agrawal Y.P. (2005) Low dose naltrexone therapy in multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 64:721-724.
- Al-Shabrawey M., Rojas M., Sanders T., Behzadian A., El-Remessy A., Bartoli M., Parpia A.K., Liou G. and Caldwell R.B. (2008) Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:3239-3244.
- Albano E., Tomasi A., Gorla-Gatti L., Poli G., Vannini V. and Dianzani M.U. (1987) Free radical metabolism of alcohols by rat liver microsomes. *Free Radic Res Commun* 3:243-249.
- Alonso M., Bekinschtein P., Cammarota M., Vianna M.R., Izquierdo I. and Medina J.H. (2005) Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. *Learn Mem* 12:504-510.
- Alvarez-Buylla A. and Garcia-Verdugo J.M. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629-634.
- Angelucci F., Brene S. and Mathe A.A. (2005) BDNF in schizophrenia, depression and corresponding animal models. *Mol Psychiatry* 10:345-352.
- Anton R.F., Drobos D.J., Voronin K., Durazo-Avizu R. and Moak D. (2004) Naltrexone effects on alcohol consumption in a clinical laboratory paradigm: temporal effects of drinking. *Psychopharmacology (Berl)* 173:32-40.
- Armstrong J.S., Steinauer K.K., Hornung B., Irish J.M., Lecane P., Birrell G.W., Peehl D.M. and Knox S.J. (2002) Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line. *Cell Death Differ* 9:252-263.
- Arnal E., Miranda M., Barcia J., Bosch-Morell F. and Romero F.J. (2010) Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166:271-278.
- Avino J., Díaz-Llopis M., Espana E., Johnsen-Soriano S., Romero B., Marin N., Muriach M., Bosch-Morell F. and Romero F.J. (2002) [Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the optic nerve of rats]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 77:263-268.
- Bahi A., Boyer F., Chandrasekar V. and Dreyer J.L. (2008) Role of accumbens BDNF and TrkB in cocaine-induced psychomotor sensitization, conditioned-place preference, and reinstatement in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 199:169-182.
- Bailey C.P. and Connor M. (2005) Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol* 5:60-68.
- Bates M.E., Bowden S.C. and Barry D. (2002) Neurocognitive impairment associated with alcohol use disorders: implications for treatment. *Exp Clin Psychopharmacol* 10:193-212.
- Beckman D.A. and Brent R.L. (1990) Teratogenesis: alcohol, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, and cocaine. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2:236-245.
- Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J., Marshall P.A. and Freeman B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1620-1624.
- Berglind W.J., See R.E., Fuchs R.A., Ghee S.M., Whitfield T.W., Jr., Miller S.W. and McGinty J.F. (2007) A BDNF infusion into the medial prefrontal cortex suppresses cocaine seeking in rats. *Eur J Neurosci* 26:757-766.

- Berke J.D. and Hyman S.E. (2000) Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* 25:515-532.
- Bernardi P., Broekemeier K.M. and Pfeiffer D.R. (1994) Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 26:509-517.
- Bibel M. and Barde Y.A. (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14:2919-2937.
- Bilang-Bleuel A., Rech J., De Carli S., Holsboer F. and Reul J.M. (2002) Forced swimming evokes a biphasic response in CREB phosphorylation in extrahypothalamic limbic and neocortical brain structures in the rat. *Eur J Neurosci* 15:1048-1060.
- Bison S. and Crews F. (2003) Alcohol withdrawal increases neuropeptide Y immunoreactivity in rat brain. *Alcohol Clin Exp Res* 27:1173-1183.
- Bosch-Morell F., Martinez-Soriano F., Colell A., Fernandez-Checa J.C. and Romero F.J. (1998) Chronic ethanol feeding induces cellular antioxidants decrease and oxidative stress in rat peripheral nerves. Effect of S-adenosyl-L-methionine and N-acetyl-L-cysteine. *Free Radic Biol Med* 25:365-368.
- Bourbon A., Vionnet M., Leprince P., Vaissier E., Copeland J., McDonagh P., Debre P. and Gandjbakhch I. (2004) The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg* 26:932-938.
- Brown J.P., Couillard-Despres S., Cooper-Kuhn C.M., Winkler J., Aigner L. and Kuhn H.G. (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 467:1-10.
- Bunnag S.C. (2006) Implications of microcirculation-research based information on prevention and treatment of diabetes mellitus type 2: a perspective. *Clin Hemorheol Microcirc* 34:43-50.
- Calabrese V., Scapagnini G., Latteri S., Colombrita C., Ravagna A., Catalano C., Pennisi G., Calvani M. and Butterfield D.A. (2002) Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine. *Int J Tissue React* 24:97-104.
- Canales J.J. (2007) Adult neurogenesis and the memories of drug addiction. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:261-270.
- Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R. and Thoenen H. (1997) Neurotrophin release by neurotrophins: implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13279-13286.
- Carlezon W.A., Jr., Duman R.S. and Nestler E.J. (2005) The many faces of CREB. *Trends Neurosci* 28:436-445.
- Colell A., Garcia-Ruiz C., Lluís J.M., Coll O., Mari M. and Fernandez-Checa J.C. (2003) Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem* 278:33928-33935.
- Colell A., Garcia-Ruiz C., Morales A., Ballesta A., Ookhtens M., Rodes J., Kaplowitz N. and Fernandez-Checa J.C. (1997) Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology* 26:699-708.
- Coligan J.E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W. and Wingfield, P. T. ed (2003) *Current Protocols in Protein Science*. USA.
- Coonfield D.L., Hill K.G., Kaczmarek H.J., Ferraro F.M., 3rd and Kiefer S.W. (2002) Low doses of naltrexone reduce palatability and consumption of ethanol in outbred rats. *Alcohol* 26:43-47.

- Costantini P., Belzacq A.S., Vieira H.L., Larochette N., de Pablo M.A., Zamzami N., Susin S.A., Brenner C. and Kroemer G. (2000) Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 19:307-314.
- Cree B.A., Kornyeveva E. and Goodin D.S. (2010) Pilot trial of low-dose naltrexone and quality of life in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68:145-150.
- Crews F.T., Mdzinarishvili A., Kim D., He J. and Nixon K. (2006) Neurogenesis in adolescent brain is potently inhibited by ethanol. *Neuroscience* 137:437-445.
- Crews F.T., Miller M.W., Ma W., Nixon K., Zawada W.M. and Zakhari S. (2003) Neural stem cells and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 27:324-335.
- Crews F.T. and Nixon K. (2003) Alcohol, neural stem cells, and adult neurogenesis. *Alcohol Res Health* 27:197-204.
- Chambers D.E., Parks D.A., Patterson G., Roy R., McCord J.M., Yoshida S., Parmley L.F. and Downey J.M. (1985) Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 17:145-152.
- Chandler L.J., Sutton G., Norwood D., Sumners C. and Crews F.T. (1997) Chronic ethanol increases N-methyl-D-aspartate-stimulated nitric oxide formation but not receptor density in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* 51:733-740.
- Christie B.R. and Cameron H.A. (2006) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16:199-207.
- Chucair A.J., Rotstein N.P., Sangiovanni J.P., During A., Chew E.Y. and Politi L.E. (2007) Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5168-5177.
- Dai X., Thavundayil J. and Gianoulakis C. (2002) Differences in the responses of the pituitary beta-endorphin and cardiovascular system to ethanol and stress as a function of family history. *Alcohol Clin Exp Res* 26:1171-1180.
- Davis M.I. (2008) Ethanol-BDNF interactions: still more questions than answers. *Pharmacol Ther* 118:36-57.
- De Bellis M.D., Clark D.B., Beers S.R., Soloff P.H., Boring A.M., Hall J., Kersh A. and Keshavan M.S. (2000) Hippocampal volume in adolescent-onset alcohol use disorders. *Am J Psychiatry* 157:737-744.
- DGPNSD (2010) Informe de la Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES) 2009/2010, in *Consumo MdS editor*, Madrid.
- Di Chiara G. and Imperato A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5274-5278.
- Diamond I. (1992) Alcohol Neurotoxicity, in *Diseases of the nervous system*. (Asbury A M. G. a. M. W. ed).
- Diehl A.M. (1992) Alcohol-related trafficking accidents. *Hepatology* 15:964-966.
- Dinarello C.A. (1997) Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 112:321S-329S.
- Dringen R. (2000) Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem* 267:4903.
- Duman R.S., Malberg J., Nakagawa S. and D'Sa C. (2000) Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry* 48:732-739.
- Duncan I.W., Culbreth P.H. and Burtis C.A. (1979) Determination of free, total, and esterified cholesterol by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 162:281-292.
- Encinas J.M., Vaahtokari A. and Enikolopov G. (2006) Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8233-8238.

- Esterbauer H., Schaur R.J. and Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81-128.
- Fehr K.A., Kalant H. and LeBlanc A.E. (1976) Residual learning deficit after heavy exposure to cannabis or alcohol in rats. *Science* 192:1249-1251.
- Feinn R. and Kranzler H.R. (2005) Does effect size in naltrexone trials for alcohol dependence differ for single-site vs. multi-center studies? *Alcohol Clin Exp Res* 29:983-988.
- Fernandez-Checa J.C. (2003) Alcohol-induced liver disease: when fat and oxidative stress meet. *Ann Hepatol* 2:69-75.
- Fernandez-Checa J.C., Garcia-Ruiz C., Colell A., Morales A., Mari M., Miranda M. and Ardite E. (1998a) Oxidative stress: role of mitochondria and protection by glutathione. *Biofactors* 8:7-11.
- Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C. and Colell A. (1998b) Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin Liver Dis* 18:389-401.
- Fernandez-Checa J.C., Kaplowitz N., Garcia-Ruiz C., Colell A., Miranda M., Mari M., Ardite E. and Morales A. (1997) GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol* 273:G7-17.
- Fillebeen C. and Pantopoulos K. (2002) Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 7:15-22.
- Fischer W., Wictorin K., Bjorklund A., Williams L.R., Varon S. and Gage F.H. (1987) Amelioration of cholinergic neuron atrophy and spatial memory impairment in aged rats by nerve growth factor. *Nature* 329:65-68.
- Flórez J. (2003) Fármacos analgésicos opioides, in *Farmacología humana* (Flórez J A. J., Mediavilla A ed) pp 461-478, Masson, Barcelona.
- Fridovich I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 23:239-257.
- Froehlich J.C., Zink R.W., Li T.K. and Christian J.C. (2000) Analysis of heritability of hormonal responses to alcohol in twins: beta-endorphin as a potential biomarker of genetic risk for alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 24:265-277.
- Fumagalli F., Di Pasquale L., Caffino L., Racagni G. and Riva M.A. (2007) Repeated exposure to cocaine differently modulates BDNF mRNA and protein levels in rat striatum and prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 26:2756-2763.
- Gabig T.G. and Babior B.M. (1979) The O<sub>2</sub>(<sup>-</sup>) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem* 254:9070-9074.
- Gadsden R.H., Taylor E.H. and Steindel S.J. (1986) Ethanol in biological fluids by enzymic analysis, in *Selected methods of emergency toxicology* (S F. C. and R F. W. eds) pp 63-65, Selected methods of clinical chemistry, Washington DC.
- Gage F.H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- Garcia-Ruiz C., Morales A., Ballesta A., Rodes J., Kaplowitz N. and Fernandez-Checa J.C. (1994) Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest* 94:193-201.
- Gardell L.R., Hubbell C.L. and Reid L.D. (1996) Naltrexone persistently reduces rats' intake of a palatable alcoholic beverage. *Alcohol Clin Exp Res* 20:584-588.
- Geuze E., Vermetten E. and Bremner J.D. (2005) MR-based in vivo hippocampal volumetrics: 2. Findings in neuropsychiatric disorders. *Mol Psychiatry* 10:160-184.
- Gianoulakis C. (1990) Characterization of the effects of acute ethanol administration on the release of beta-endorphin peptides by the rat hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 180:21-29.
- Gianoulakis C. (1993) Endogenous opioids and excessive alcohol consumption. *J Psychiatry Neurosci* 18:148-156.



- Gianoulakis C. (1996) Implications of endogenous opioids and dopamine in alcoholism: human and basic science studies. *Alcohol Alcohol Suppl* 1:33-42.
- Gianoulakis C. and de Waele J.P. (1994) Genetics of alcoholism: role of the endogenous opioid system. *Metab Brain Dis* 9:105-131.
- Gianoulakis C., Guillaume P., Thavundayil J. and Gutkowska J. (1997) Increased plasma atrial natriuretic peptide after ingestion of low doses of ethanol in humans. *Alcohol Clin Exp Res* 21:162-170.
- Gianoulakis C., Krishnan B. and Thavundayil J. (1996) Enhanced sensitivity of pituitary beta-endorphin to ethanol in subjects at high risk of alcoholism. *Arch Gen Psychiatry* 53:250-257.
- Giugliano D., Ceriello A. and Paolisso G. (1996) Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257-267.
- Gonzalez J.P. and Brogden R.N. (1988) Naltrexone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs* 35:192-213.
- Graham D.L., Edwards S., Bachtell R.K., DiLeone R.J., Rios M. and Self D.W. (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat Neurosci* 10:1029-1037.
- Greeneltch K.M., Haudenschild C.C., Keegan A.D. and Shi Y. (2004) The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav Immun* 18:476-484.
- Gross C.G. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci* 1:67-73.
- Guitart X., Thompson M.A., Mirante C.K., Greenberg M.E. and Nestler E.J. (1992) Regulation of cyclic AMP response element-binding protein (CREB) phosphorylation by acute and chronic morphine in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 58:1168-1171.
- Gupta A., Tripathi A.K., Tripathi R.L., Madhu S.V. and Banerjee B.D. (2007) Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys* 44:373-378.
- Gutstein H.B. and Akil H. (2001) Opioid Analgesics, in *The pharmacological basis of therapeutics* (Hardman JG L. L., Gilman AG ed) pp 569-619, McGraw-Hill, New York.
- Guzman-Marin R., Bashir T., Suntsova N., Szymusiak R. and McGinty D. (2007) Hippocampal neurogenesis is reduced by sleep fragmentation in the adult rat. *Neuroscience* 148:325-333.
- Hagiwara M., Alberts A., Brindle P., Meinkoth J., Feramisco J., Deng T., Karin M., Shenolikar S. and Montminy M. (1992) Transcriptional attenuation following cAMP induction requires PP-1-mediated dephosphorylation of CREB. *Cell* 70:105-113.
- Halestrap A.P. and Davidson A.M. (1990) Inhibition of Ca<sup>2+</sup>(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 268:153-160.
- Halliwell B. (2000) Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants, in *Antioxidants in Diabetes Management* (Packer L., Rösen, P., Tritschler, H.J., King, G.L. and Azzi A., ed) pp 33-52, Marcel Dekker, New York.
- Halliwell B. and Gutteridge J.M. (1986) Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246:501-514.

- Haorah J., Knipe B., Leibhart J., Ghorpade A. and Persidsky Y. (2005) Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol* 78:1223-1232.
- Haorah J., Ramirez S.H., Floreani N., Gorantla S., Morsey B. and Persidsky Y. (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 45:1542-1550.
- Harding A.J., Wong A., Svoboda M., Kril J.J. and Halliday G.M. (1997) Chronic alcohol consumption does not cause hippocampal neuron loss in humans. *Hippocampus* 7:78-87.
- Hardy K. and Hunt N.H. (2004) Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 37:1550-1563.
- Harper C. and Matsumoto I. (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5:73-78.
- Hausladen A. and Stamler J.S. (1999) Nitrosative stress. *Methods Enzymol* 300:389-395.
- He J., Nixon K., Shetty A.K. and Crews F.T. (2005) Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur J Neurosci* 21:2711-2720.
- Heilig M. and Koob G.F. (2007) A key role for corticotropin-releasing factor in alcohol dependence. *Trends Neurosci* 30:399-406.
- Herrera D.G., Yague A.G., Johnsen-Soriano S., Bosch-Morell F., Collado-Morente L., Muriach M., Romero F.J. and Garcia-Verdugo J.M. (2003) Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7919-7924.
- Herz A. (1997) Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)* 129:99-111.
- Hoffman P.L. and Tabakoff B. (1990) Ethanol and guanine nucleotide binding proteins: a selective interaction. *FASEB J* 4:2612-2622.
- Huang E.J. and Reichardt L.F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72:609-642.
- Hunter D.R., Haworth R.A. and Southard J.H. (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* 251:5069-5077.
- Jamensky N.T. and Gianoulakis C. (1997) Content of dynorphins and kappa-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1455-1464.
- Janero D.R. (1990) Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515-540.
- Jareno E.J., Roma J., Romero B., Marin N., Muriach M., Johnsen S., Bosch-Morell F., Marselou L. and Romero F.J. (2002) Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res* 36:341-344.
- Jindal V. and Gill K.D. (1999) Ethanol potentiates lead-induced inhibition of rat brain antioxidant defense systems. *Pharmacol Toxicol* 85:16-21.
- Johnsen-Soriano S., Bosch-Morell F., Miranda M., Asensio S., Barcia J.M., Roma J., Monfort P., Felipe V. and Romero F.J. (2007a) Ebselen prevents chronic alcohol-induced rat hippocampal stress and functional impairment. *Alcohol Clin Exp Res* 31:486-492.
- Johnsen-Soriano S., Genoves J.M., Romero B., Garcia-Delpech S., Muriach M., Sancho-Tello M., Bosch-Morell F. and Romero F.J. (2007b) [Chronic ethanol feeding induces oxidative stress in the rat retina: treatment with the antioxidant ebselen]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 82:757-762.
- Johnson B.A. (2000) Serotonergic agents and alcoholism treatment: rebirth of the subtype concept--an hypothesis. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1597-1601.

- Josselyn S.A., Shi C., Carlezon W.A., Jr., Neve R.L., Nestler E.J. and Davis M. (2001) Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci* 21:2404-2412.
- Juárez J. (2004) Neurobiología de las adicciones, in *Temas selectos de neurociencias III* (Velázquez M. ed) pp 225-237, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico.
- Juric D.M., Miklic S. and Carman-Krzan M. (2006) Monoaminergic neuronal activity up-regulates BDNF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Brain Res* 1108:54-62.
- Kalant H. (1985) Interactions of ethanol and neuropeptides, in *Research advances in new psychopharmacological treatments for alcoholism* (Naranjo CA S. E. ed) pp 69–85, Amsterdam.
- Karege F., Perret G., Bondolfi G., Schwald M., Bertschy G. and Aubry J.M. (2002) Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels in major depressed patients. *Psychiatry Res* 109:143-148.
- Kas J. and Blattna J. (1986) Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha)* 32:81-92.
- Kempermann G. and Gage F.H. (2000) Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp* 231:220-235; discussion 235-241, 302-226.
- Kiefer F., Hortrich M., Jahn H. and Wiedemann K. (2002) Is withdrawal-induced anxiety in alcoholism based on beta-endorphin deficiency? *Psychopharmacology (Berl)* 162:433-437.
- Klatt P. and Lamas S. (2000) Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267:4928-4944.
- Koch O.R., Pani G., Borrello S., Colavitti R., Cravero A., Farre S. and Galeotti T. (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol Aspects Med* 25:191-198.
- Kono H., Arteel G.E., Rusyn I., Sies H. and Thurman R.G. (2001) Ebselen prevents early alcohol-induced liver injury in rats. *Free Radic Biol Med* 30:403-411.
- Koob G.F. (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* 13:177-184.
- Koob G.F. and Nestler E.J. (1997) The neurobiology of drug addiction. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9:482-497.
- Koob G.F., Roberts A.J., Schulteis G., Parsons L.H., Heyser C.J., Hyytia P., Merlo-Pich E. and Weiss F. (1998) Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 22:3-9.
- Kosower N.S. and Kosower E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 54:109-160.
- Krause S., Schindowski K., Zechel S. and von Bohlen und Halbach O. (2008) Expression of trkB and trkC receptors and their ligands brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the murine amygdala. *J Neurosci Res* 86:411-421.
- Kreibich A.S., Briand L., Cleck J.N., Ecke L., Rice K.C. and Blendy J.A. (2009) Stress-induced potentiation of cocaine reward: a role for CRF R1 and CREB. *Neuropsychopharmacology* 34:2609-2617.
- Krzyzanski W., Oberdoester J. and Rabin R.A. (2007) Mechanism of ethanol enhancement of apoptosis and caspase activation in serum-deprived PC12 cells. *Life Sci* 81:756-764.
- Kuan C.Y., Schloemer A.J., Lu A., Burns K.A., Weng W.L., Williams M.T., Strauss K.I., Vorhees C.V., Flavell R.A., Davis R.J., Sharp F.R. and Rakic P. (2004) Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* 24:10763-10772.
- Kuczewski N., Porcher C., Lessmann V., Medina I. and Gaiarsa J.L. (2009) Activity-dependent dendritic release of BDNF and biological consequences. *Mol Neurobiol* 39:37-49.

- Kuhn H.G., Dickinson-Anson H. and Gage F.H. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16:2027-2033.
- Kukreja R.C. and Hess M.L. (1992) The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 26:641-655.
- Kukreja R.C. and Janin Y. (1997) Reperfusion Injury: Basic Concepts and Protection Strategies. *J Thromb Thrombolysis* 4:7-24.
- Lane-Ladd S.B., Pineda J., Boundy V.A., Pfeuffer T., Krupinski J., Aghajanian G.K. and Nestler E.J. (1997) CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* 17:7890-7901.
- Lawrence R.A., Parkhill L.K. and Burk R.F. (1978) Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 108:981-987.
- Lee Y.K., Park S.W., Kim Y.K., Kim D.J., Jeong J., Myrick H. and Kim Y.H. (2005) Effects of naltrexone on the ethanol-induced changes in the rat central dopaminergic system. *Alcohol Alcohol* 40:297-301.
- Lejoyeux M., Mc Loughlin M. and Ades J. (2000) Epidemiology of behavioral dependence: literature review and results of original studies. *Eur Psychiatry* 15:129-134.
- Lessmann V. (1998) Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. *Gen Pharmacol* 31:667-674.
- Li Z.G., Zhang W., Grunberger G. and Sima A.A. (2002) Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 946:221-231.
- Lie D.C., Song H., Colamarino S.A., Ming G.L. and Gage F.H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:399-421.
- Lieber C.S. (1997) Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol* 38:601-628.
- Lieber C.S. (2004) The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system. *J Hepatol* 40:198-202.
- Lieber C.S., DeCarli L.M. and Sorrell M.F. (1989) Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology* 10:501-510.
- Lieber C.S., Jones D.P. and Decarli L.M. (1965) Effects of Prolonged Ethanol Intake: Production of Fatty Liver Despite Adequate Diets. *J Clin Invest* 44:1009-1021.
- Lin S.L., Lee Y.M., Chang H.Y., Cheng Y.W. and Yen M.H. (2005) Effects of naltrexone on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. *J Biomed Sci* 12:431-440.
- Logrip M.L., Janak P.H. and Ron D. (2009) Escalating ethanol intake is associated with altered corticostriatal BDNF expression. *J Neurochem* 109:1459-1468.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Lu L., Dempsey J., Liu S.Y., Bossert J.M. and Shaham Y. (2004) A single infusion of brain-derived neurotrophic factor into the ventral tegmental area induces long-lasting potentiation of cocaine seeking after withdrawal. *J Neurosci* 24:1604-1611.
- Lledo P.M., Alonso M. and Grubb M.S. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7:179-193.
- MacLennan A.J., Lee N. and Walker D.W. (1995) Chronic ethanol administration decreases brain-derived neurotrophic factor gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett* 197:105-108.

- Macho A., Hirsch T., Marzo I., Marchetti P., Dallaporta B., Susin S.A., Zamzami N. and Kroemer G. (1997) Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis. *J Immunol* 158:4612-4619.
- Maffi S.K., Rathinam M.L., Cherian P.P., Pate W., Hamby-Mason R., Schenker S. and Henderson G.I. (2008) Glutathione content as a potential mediator of the vulnerability of cultured fetal cortical neurons to ethanol-induced apoptosis. *J Neurosci Res* 86:1064-1076.
- Marinelli P.W., Bai L., Quirion R. and Gianoulakis C. (2005) A microdialysis profile of Met-enkephalin release in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1821-1828.
- Marinelli P.W., Kiianmaa K. and Gianoulakis C. (2000) Opioid propeptide mRNA content and receptor density in the brains of AA and ANA rats. *Life Sci* 66:1915-1927.
- Marinelli P.W., Quirion R. and Gianoulakis C. (2003) A microdialysis profile of beta-endorphin and catecholamines in the rat nucleus accumbens following alcohol administration. *Psychopharmacology (Berl)* 169:60-67.
- Marmigere F., Givalois L., Rage F., Arancibia S. and Tapia-Arancibia L. (2003) Rapid induction of BDNF expression in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* 13:646-655.
- Mayer B. and Hemmens B. (1997) Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22:477-481.
- Mayr B. and Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:599-609.
- McCord J.M. (1998) Iron, free radicals, and oxidative injury. *Semin Hematol* 35:5-12.
- McGough N.N., He D.Y., Logrip M.L., Jeanblanc J., Phamluong K., Luong K., Kharazia V., Janak P.H. and Ron D. (2004) RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci* 24:10542-10552.
- Meister A. and Anderson M.E. (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- Meredith M.J. and Reed D.J. (1982) Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 257:3747-3753.
- Meredith M.J. and Reed D.J. (1983) Depletion in vitro of mitochondrial glutathione in rat hepatocytes and enhancement of lipid peroxidation by adriamycin and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU). *Biochem Pharmacol* 32:1383-1388.
- Minamiyama Y., Takemura S., Tsukioka T., Shinkawa H., Kobayashi F., Nishikawa Y., Kodai S., Mizuguchi S., Suehiro S. and Okada S. (2007) Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Biofactors* 30:91-104.
- Ming G.L. and Song H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.
- Morris S.A., Kelso M.L., Liput D.J., Marshall S.A. and Nixon K. (2010) Similar withdrawal severity in adolescents and adults in a rat model of alcohol dependence. *Alcohol* 44:89-98.
- Muriach M., Bosch-Morell F., Alexander G., Blomhoff R., Barcia J., Arnal E., Almansa I., Romero F.J. and Miranda M. (2006) Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 41:979-984.
- Nestler E.J. (2001) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2:119-128.
- Nestler E.J. (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78:637-647.
- Nixon K. and Crews F.T. (2002) Binge ethanol exposure decreases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurochem* 83:1087-1093.

- Nixon K. and Crews F.T. (2004) Temporally specific burst in cell proliferation increases hippocampal neurogenesis in protracted abstinence from alcohol. *J Neurosci* 24:9714-9722.
- Nordmann R. (1994) Alcohol and antioxidant systems. *Alcohol Alcohol* 29:513-522.
- O'Malley S.S. (1995) Integration of opioid antagonists and psychosocial therapy in the treatment of narcotic and alcohol dependence. *J Clin Psychiatry* 56 Suppl 7:30-38.
- O'Malley S.S. (1996) Opioid antagonists in the treatment of alcohol dependence: clinical efficacy and prevention of relapse. *Alcohol Alcohol* 31 Suppl 1:77-81.
- O'Malley S.S., Jaffe A.J., Chang G., Schottenfeld R.S., Meyer R.E. and Rounsaville B. (1992) Naltrexone and coping skills therapy for alcohol dependence. A controlled study. *Arch Gen Psychiatry* 49:881-887.
- Omodeo-Sale F., Gramigna D. and Campaniello R. (1997) Lipid peroxidation and antioxidant systems in rat brain: effect of chronic alcohol consumption. *Neurochem Res* 22:577-582.
- Palmer T.D., Takahashi J. and Gage F.H. (1997) The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8:389-404.
- Palmieri F., Bisaccia F., Capobianco L., Dolce V., Fiermonte G., Iacobazzi V. and Zara V. (1993) Transmembrane topology, genes, and biogenesis of the mitochondrial phosphate and oxoglutarate carriers. *J Bioenerg Biomembr* 25:493-501.
- Pandey S.C., Roy A. and Zhang H. (2003) The decreased phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) response element binding (CREB) protein in the central amygdala acts as a molecular substrate for anxiety related to ethanol withdrawal in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 27:396-409.
- Pandey S.C., Zhang D., Mittal N. and Nayyar D. (1999) Potential role of the gene transcription factor cyclic AMP-responsive element binding protein in ethanol withdrawal-related anxiety. *J Pharmacol Exp Ther* 288:866-878.
- Pandey S.C., Zhang H., Ugale R., Prakash A., Xu T. and Misra K. (2008) Effector immediate-early gene arc in the amygdala plays a critical role in alcoholism. *J Neurosci* 28:2589-2600.
- Paravicini T.M. and Touyz R.M. (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S170-180.
- Pardon M.C., Roberts R.E., Marsden C.A., Bianchi M., Latif M.L., Duxon M.S. and Kendall D.A. (2005) Social threat and novel cage stress-induced sustained extracellular-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation but differential modulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the hippocampus of NMRI mice. *Neuroscience* 132:561-574.
- Parkes H. and Sinclair J.D. (2000) Reduction of alcohol drinking and upregulation of opioid receptors by oral naltrexone in AA rats. *Alcohol* 21:215-221.
- Payabvash S., Beheshtian A., Salmasi A.H., Kiumehr S., Ghahremani M.H., Tavangar S.M., Sabzevari O. and Dehpour A.R. (2006) Chronic morphine treatment induces oxidant and apoptotic damage in the mice liver. *Life Sci* 79:972-980.
- Payabvash S., Kiumehr S., Nezami B.G., Zandieh A., Anvari P., Tavangar S.M. and Dehpour A.R. (2007) Endogenous opioids modulate hepatocyte apoptosis in a rat model of chronic cholestasis: the role of oxidative stress. *Liver Int* 27:538-547.
- Peterson J.B., Conrod P., Vassileva J., Gianoulakis C. and Pihl R.O. (2006) Differential effects of naltrexone on cardiac, subjective and behavioural reactions to acute ethanol intoxication. *J Psychiatry Neurosci* 31:386-393.
- Pettinati H.M., O'Brien C.P., Rabinowitz A.R., Wortman S.P., Oslin D.W., Kampman K.M. and Dackis C.A. (2006) The status of naltrexone in the treatment of alcohol dependence: specific effects on heavy drinking. *J Clin Psychopharmacol* 26:610-625.

- Pfefferbaum A., Lim K.O., Zipursky R.B., Mathalon D.H., Rosenbloom M.J., Lane B., Ha C.N. and Sullivan E.V. (1992) Brain gray and white matter volume loss accelerates with aging in chronic alcoholics: a quantitative MRI study. *Alcohol Clin Exp Res* 16:1078-1089.
- Pizzorusso T., Ratto G.M., Putignano E. and Maffei L. (2000) Brain-derived neurotrophic factor causes cAMP response element-binding protein phosphorylation in absence of calcium increases in slices and cultured neurons from rat visual cortex. *J Neurosci* 20:2809-2816.
- Poo M.M. (2001) Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2:24-32.
- Pryor W.A. and Stanley J.P. (1975) Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 40:3615-3617.
- Radi R., Beckman J.S., Bush K.M. and Freeman B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 288:481-487.
- Rakic P. (2002) Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22:614-618.
- Ramachandran S., Croft P. and Neary R.H. (2003a) A prospective study in primary care in patients without vascular disease comparing levels of coronary risk factors in those recommended for lipid-lowering drugs based on either absolute risk or absolute risk reduction. *Prev Cardiol* 6:17-21.
- Ramachandran V., Watts L.T., Maffi S.K., Chen J., Schenker S. and Henderson G. (2003b) Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 74:577-588.
- Ramón y Cajal S. (1928) *Degeneration and regeneration of the Nervous System*. Hafner, New York.
- Rao M.S., Hattiangady B. and Shetty A.K. (2006) The window and mechanisms of major age-related decline in the production of new neurons within the dentate gyrus of the hippocampus. *Aging Cell* 5:545-558.
- Rao M.S. and Shetty A.K. (2004) Efficacy of doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 19:234-246.
- Ray A., Mediratta P.K. and Sen P. (1992) Modulation by naltrexone of stress-induced changes in humoral immune responsiveness and gastric mucosal integrity in rats. *Physiol Behav* 51:293-296.
- Reed D.J., Babson J.R., Beatty P.W., Brodie A.E., Ellis W.W. and Potter D.W. (1980) High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 106:55-62.
- Reichardt L.F. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1545-1564.
- Richard M.J., Guiraud P., Meo J. and Favier A. (1992) High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 577:9-18.
- Richardson H.N., Chan S.H., Crawford E.F., Lee Y.K., Funk C.K., Koob G.F. and Mandyam C.D. (2009) Permanent impairment of birth and survival of cortical and hippocampal proliferating cells following excessive drinking during alcohol dependence. *Neurobiol Dis* 36:1-10.
- Rihn L.L. and Claiborne B.J. (1990) Dendritic growth and regression in rat dentate granule cells during late postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 54:115-124.

- Rius R.A., Govoni S., Bergamaschi S., Lucchi L. and Trabucchi M. (1988) Mechanisms of the effect of lead on brain neurotransmission: a calcium mediated action. *Sci Total Environ* 71:441-448.
- Romero F.J. and Sies H. (1984) Subcellular glutathione contents in isolated hepatocytes treated with L-buthionine sulfoximine. *Biochem Biophys Res Commun* 123:1116-1121.
- Romero F.J., Soboll S. and Sies H. (1984) Mitochondrial and cytosolic glutathione after depletion by phorone in isolated hepatocytes. *Experientia* 40:365-367.
- Romero M.J., Bosch-Morell F., Romero B., Rodrigo J.M., Serra M.A. and Romero F.J. (1998) Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 25:993-997.
- Room R., Babor T. and Rehm J. (2005) Alcohol and public health. *Lancet* 365:519-530.
- Rouach H., Houze P., Gentil M., Orfanelli M.T. and Nordmann R. (1997) Changes in some pro- and antioxidants in rat cerebellum after chronic alcohol intake. *Biochem Pharmacol* 53:539-545.
- Ryabinin A.E. (1998) Role of hippocampus in alcohol-induced memory impairment: implications from behavioral and immediate early gene studies. *Psychopharmacology (Berl)* 139:34-43.
- Sancho-Tello M., Muriach M., Barcia J., Bosch-Morell F., Genoves J.M., Johnsen-Soriano S., Romero B., Almansa I., Diaz-Llopis M., Garcia-Delpech S., Roma J. and Romero F.J. (2008) Chronic alcohol feeding induces biochemical, histological, and functional alterations in rat retina. *Alcohol Alcohol* 43:254-260.
- Saravia F., Revsin Y., Lux-Lantos V., Beauquis J., Homo-Delarche F. and De Nicola A.F. (2004) Oestradiol restores cell proliferation in dentate gyrus and subventricular zone of streptozotocin-diabetic mice. *J Neuroendocrinol* 16:704-710.
- Satriano J.A., Shuldiner M., Hora K., Xing Y., Shan Z. and Schlondorff D. (1993) Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest* 92:1564-1571.
- Schlörff E.C., Husain K. and Somani S.M. (1999) Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 18:203-214.
- Schmidt-Hieber C., Jonas P. and Bischofberger J. (2004) Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429:184-187.
- Schramm H., Robertson L.W. and Oesch F. (1985) Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 34:3735-3739.
- Self D.W. and Nestler E.J. (1995) Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction. *Annu Rev Neurosci* 18:463-495.
- Setiawan E., Pihl R.O., Cox S.M., Gianoulakis C., Palmour R.M., Benkelfat C. and Leyton M. (2011) The Effect of Naltrexone on Alcohol's Stimulant Properties and Self-Administration Behavior in Social Drinkers: Influence of Gender and Genotype. *Alcohol Clin Exp Res*.
- Sharafaddinzadeh N., Moghtaderi A., Kashipazha D., Majdinasab N. and Shalbfan B. (2010) The effect of low-dose naltrexone on quality of life of patients with multiple sclerosis: a randomized placebo-controlled trial. *Mult Scler* 16:964-969.
- Sies H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks, in *Oxidative Stress* (Sies H. ed) pp 1-8, Academic Press, London.
- Sies H. (1991) *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. Academic Press., London.
- Simpkins C.O., Ives N., Tate E. and Johnson M. (1985) Naloxone inhibits superoxide release from human neutrophils. *Life Sci* 37:1381-1386.



- Smoly J.M., Kuylenstierna B. and Ernster L. (1970) Topological and functional organization of the mitochondrion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 66:125-131.
- Sobocanec S., Kusic B., Sverko V., Balog T. and Marotti T. (2006) Methionine-enkephalin modulated regulation of oxidant/antioxidant status in liver of CBA mice. *Biogerontology* 7:53-62.
- Spanagel R. (2009) Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev* 89:649-705.
- Stanciu M., Radulovic J. and Spiess J. (2001) Phosphorylated cAMP response element binding protein in the mouse brain after fear conditioning: relationship to Fos production. *Brain Res Mol Brain Res* 94:15-24.
- Sultatos L.G. (1988) Effects of acute ethanol administration on the hepatic xanthine dehydrogenase/oxidase system in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 246:946-949.
- Sullivan E.V., Marsh L., Mathalon D.H., Lim K.O. and Pfefferbaum A. (1995) Anterior hippocampal volume deficits in nonamnesic, aging chronic alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 19:110-122.
- Sun A.Y., Ingelman-Sundberg M., Neve E., Matsumoto H., Nishitani Y., Minowa Y., Fukui Y., Bailey S.M., Patel V.B., Cunningham C.C., Zima T., Fialova L., Mikulikova L., Popov P., Malbohan I., Janebova M., Nesporka K. and Sun G.Y. (2001) Ethanol and oxidative stress. *Alcohol Clin Exp Res* 25:237S-243S.
- Surekha R.H., Srikanth B.B., Jharna P., Ramachandra R.V., Dayasagar R.V. and Jyothy A. (2007) Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction. *Singapore Med J* 48:137-142.
- Svensk A.M., Soini Y., Paakko P., Hiravikoski P. and Kinnula V.L. (2004) Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 122:395-404.
- Swift R.M. (1999) Drug therapy for alcohol dependence. *N Engl J Med* 340:1482-1490.
- Tabakoff B. and Hoffman P.L. (1996) Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 16:909-912.
- Tabuchi Y., Sugiyama N., Horiuchi T., Furusawa M. and Furuhashi K. (1995) Ebselen, a seleno-organic compound, protects against ethanol-induced murine gastric mucosal injury in both in vivo and in vitro systems. *Eur J Pharmacol* 272:195-201.
- Tao X., Finkbeiner S., Arnold D.B., Shaywitz A.J. and Greenberg M.E. (1998) Ca<sup>2+</sup> influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.
- Telfer J.F. and Brock J.H. (2004) Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 10:BR91-95.
- Thorsell A. (2008) Central neuropeptide Y in anxiety- and stress-related behavior and in ethanol intake. *Ann N Y Acad Sci* 1148:136-140.
- Torchinsky A. and Toder V. (2007) TNF $\alpha$  in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: functions and targets. *Rev Diabet Stud* 4:200-209.
- Touyz R.M. (2004) Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44:248-252.
- Trush M.A., Mimnaugh E.G. and Gram T.E. (1982) Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 31:3335-3346.
- Van Vleet J.F., Boon G.D. and Ferrans V.J. (1981) Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc: protection by selenium or vitamin E supplements. *Am J Vet Res* 42:1206-1217.

- Vargas-Perez H., Ting A.K.R., Walton C.H., Hansen D.M., Razavi R., Clarke L., Bufalino M.R., Allison D.W., Steffensen S.C. and van der Kooy D. (2009) Ventral tegmental area BDNF induces an opiate-dependent-like reward state in naive rats. *Science* 324:1732-1734.
- Vieira H.L., Belzacq A.S., Haouzi D., Bernassola F., Cohen I., Jacotot E., Ferri K.F., El Hamel C., Bartle L.M., Melino G., Brenner C., Goldmacher V. and Kroemer G. (2001) The adenine nucleotide translocator: a target of nitric oxide, peroxyxynitrite, and 4-hydroxynonenal. *Oncogene* 20:4305-4316.
- Volpicelli J.R., Alterman A.I., Hayashida M. and O'Brien C.P. (1992) Naltrexone in the treatment of alcohol dependence. *Arch Gen Psychiatry* 49:876-880.
- Wadzinski B.E., Wheat W.H., Jaspers S., Peruski L.F., Jr., Lickteig R.L., Johnson G.L. and Klemm D.J. (1993) Nuclear protein phosphatase 2A dephosphorylates protein kinase A-phosphorylated CREB and regulates CREB transcriptional stimulation. *Mol Cell Biol* 13:2822-2834.
- Walker D.W., Barnes D.E., Zornetzer S.F., Hunter B.E. and Kubanis P. (1980) Neuronal loss in hippocampus induced by prolonged ethanol consumption in rats. *Science* 209:711-713.
- Walker D.W. and Freund G. (1971) Impairment of shuttle box avoidance learning following prolonged alcohol consumption in rats. *Physiol Behav* 7:773-778.
- Walker D.W. and Freund G. (1973) Impairment of timing behavior after prolonged alcohol consumption in rats. *Science* 182:597-599.
- Walters C.L., Kuo Y.C. and Blendy J.A. (2003) Differential distribution of CREB in the mesolimbic dopamine reward pathway. *J Neurochem* 87:1237-1244.
- Wand G.S. and Levine M.A. (1991) Hormonal tolerance to ethanol is associated with decreased expression of the GTP-binding protein, Gs alpha, and adenylyl cyclase activity in ethanol-treated LS mice. *Alcohol Clin Exp Res* 15:705-710.
- Wang C.C., Cheng P.Y., Peng Y.J., Wu E.S., Wei H.P. and Yen M.H. (2008) Naltrexone protects against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced hepatitis in mice. *J Pharmacol Sci* 108:239-247.
- Weiss F., Lorang M.T., Bloom F.E. and Koob G.F. (1993) Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants. *J Pharmacol Exp Ther* 267:250-258.
- Weiss F. and Porrino L.J. (2002) Behavioral neurobiology of alcohol addiction: recent advances and challenges. *J Neurosci* 22:3332-3337.
- White A.M., Matthews D.B. and Best P.J. (2000) Ethanol, memory, and hippocampal function: a review of recent findings. *Hippocampus* 10:88-93.
- Wilson R. (1979) Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo?. , in *Oxygen free radicals* (65 C. F. S. ed) pp 19-35, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Winyard PG M.C., Winrow VR, Zaidi M, Blake D. (1999) Free radical pathways in the inflammatory response, in *Free radical damage and its control* (Rice-Evans CA. B., RH. ed) pp 361-383, Elsevier Science BV, Amsterdam.
- Younger J. and Mackey S. (2009) Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study. *Pain Med* 10:663-672.
- Zafra F., Lindholm D., Castren E., Hartikka J. and Thoenen H. (1992) Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4793-4799.
- Zimmerman M.C., Lazartigues E., Lang J.A., Sinnayah P., Ahmad I.M., Spitz D.R. and Davisson R.L. (2002) Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 91:1038-1045.