



Vías de señalización y potenciales agentes terapéuticos en un modelo *in vitro* de síndrome alcohólico fetal

Javier Selva Sánchez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias
Facultad de Medicina

VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y POTENCIALES AGENTES TERAPÉUTICOS EN UN MODELO *IN VITRO* DE SÍNDROME ALCOHÓLICO FETAL



**Tesis presentada por Javier Selva Sánchez
para optar al título de Doctor por la Universidad de Barcelona**

Programa de Doctorado en Biomedicina

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. Gustavo Egea Guri, en el Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona.

Dr. Gustavo Egea Guri
(director)

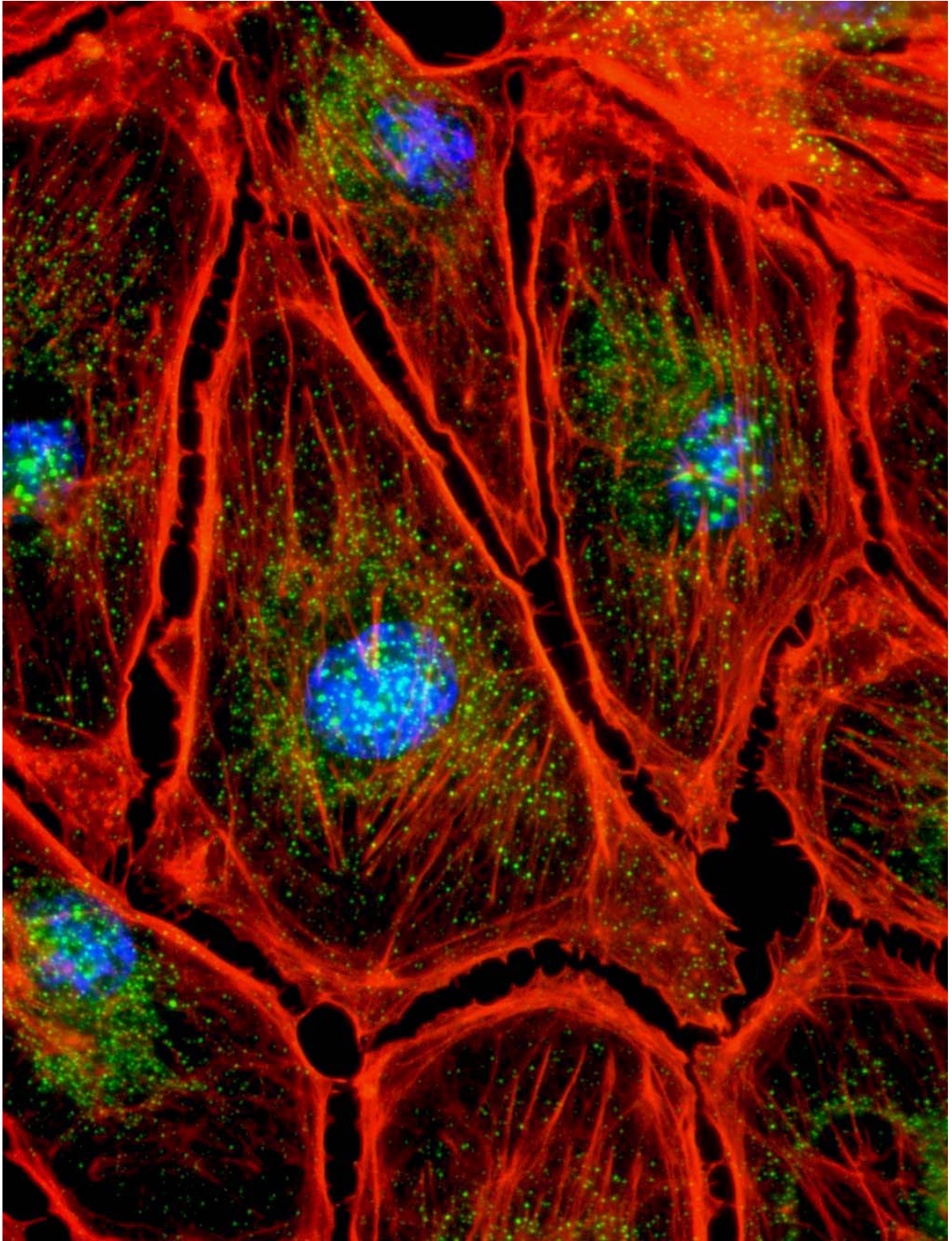
Javier Selva Sánchez
(doctorando)

Barcelona, Diciembre del 2010

Esta tesis está dedicada a
Asun, Javier, Conchi, Álvaro, Vanesa y Paula

***”Nobody really knows
Where they're supposed to go
Hiding behind a wall
Afraid that they'll lose it all
But it's alright
Just follow the light
And don't be afraid of the dark”***

(Follow the Light – Travis – The Invisible Band, 2001)



AGRADECIMIENTOS

Todos aquellos que cojáis este 'rollo' de 250 páginas aproximadamente, para leerlo, cotillearlo, buscar información, utilizarlo como cuña para la pata de la mesa, posavasos o como tope de otros libros en la estantería, debéis saber que aunque el nombre de un servidor aparece en las primeras páginas, no es ni mucho menos el único artífice de esta tesis. Por eso, ahora es el momento que conozcáis todas aquellas personas a las cuales les tengo mucho que agradecer.

Primer volia agrair al meu director de tesis, Gustavo. Gràcies per donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi al teu laboratori, d'anar a altres laboratoris, aprendre diferents tècniques, poder assistir a cursos i congressos, gaudir aprenent i que no em faltés mai res per poder desenvolupar aquesta tesi. Gràcies per la teva confiança, recolzament, motivació, comprensió, paciència i tractar-me amb tot el respecte, tot i les 'parides' que he arribat a dir o fer. Crec que durant aquest camí tots dos ens hem conegut i hem après l'un de l'altre, però també recordo que ens hem rigut molt i ho hem passat bé.....i com diu un amic meu....."al final els petits detalls son els que contenen".

També volia agrair a en Miquel Porta, per donar-me l'oportunitat de començar en el món de la recerca. Gràcies pel teu rigor i exigència que han fet que millori com investigador i professional. D'aquell any en el IMIM guardo molts bons records i vaig coincidir amb gent amb la qual encara que no vegi tant, no podré mai d'oblidar-la. L' Eli, la meva magnífica companya dels COPs, vaig aprendre molt de tu i m'ho vaig passar molt bé. Los estadísticos 'Chip i Chop' Tomás y Jose, ¿os acordáis cuando Paco Real nos pilló mirando Cálico Electrónico? y ¿cuándo actualizábamos tablas?; la Marta, sempre disposada a dedicar-te el temps que calgués i una 'curranta' de treure's el barret; la Dra. Morales con su diccionario panocho, Betty la supermegageishpower, ajaja, el Diego, el meu meteoròleg preferit. Tampoc vull oblidar-me de la Isa, l'Olga i la Laura. Quería mandar un beso muy gordo a Londres, a la Dra. Elena Ortiz, por su gran gusto musical y felicidad contagiosa.

La segunda persona que más ha influido en esta tesis ha sido Susana. Quería agradecerte todo el tiempo y la paciencia que dedicaste a enseñarme, confiar en mí cuando aparecí para hacer la tesis y por tus consejos y correcciones. Gracias a todo ello, hoy puedo escribir esta tesis. Te deseo lo mejor.

La comissió de seguiment d'aquesta tesi doctoral, també ha contribuït en aquesta tesi amb aportacions que han millorat la recerca feta. Per aquest motiu, volia agrair a la Dra. Dolores López-Tejero, el Dr. Josep García-Valero i el Dr. Xavier Parés.

También es importante que sepáis que esta tesis ha durado 4 años y dos meses, gracias a la impagable ayuda de Maite Muñoz. Sin ti, esta tesis duraría cuatro años más, gracias por tu trabajo diario y dedicación en el laboratorio. En el transcurso de esta tesis, a nivel personal, has sido una persona muy especial para mi.

Aquesta tesi podria dedicar-la per exemple al Xavi Bosch pels matins de Rac1, o a en Pep Guardiola per ser un gran entrenador, o al cuiner-bomber de l'Antic Forn.....però prefereixo dedicar-la a la família Crespo-March o a la família Xifró-Collsabata, per tenir en elles a dos grans persones, na 'meva Emparito' i en 'Xavito'. Heu sigut dos persones molt importants en aquesta tesi i la vostra companyia a fet tot molt més fàcil. Una de les millors coses que m'ha donat aquesta tesi és la vostra amistat, ara que la tinc, no la vull deixar escapar.

Cuando entré en el laboratorio, se sobreentiende que era un 'pipiolo', hubo una serie de gente que ya no están, que me recibieron con los brazos abiertos y con los que pude compartir muchos momentos dentro y fuera del laboratorio. Los delincuentes en cuestión eran: Yovan, tenerte en el laboratorio era un 'lujo asiático', ¿te acuerdas aquel día que santiguábamos las

esquinas? jejeje; Mrs. Pilet, la gran organizadora, siempre viajando y con ese moreno permanente (que rabia!!), si no fuese por ti ya no mantendría el contacto con nadie, gracias por ser así; Emma, la 'huertana' más bonita y maja que existe, vente a Barcelona de concierto algún día; el ilustrísimo Dr.Chucho, poseedor de un gran sentido del humor y peor fútbol; JMan, el único! el 'pescaito' de Dundee, un tío de pies a cabeza y de aquellas personas que dejan huella, ¿existe el Marcatoon de Romaric? (Katie, un besazo!).

Hubo otros con los que también compartimos muy buenos momentos, aunque fueron cortos: JR; Aris; Maria Rifé (una gran sarrianenca); Sergi (café, copa i puro....). Begoño, una tía que te sorprende por minutos y para descojonarse toda una vida, pocas hay como tu. Susana Granell, gràcies per tota la teva ajuda al labo i felicitats per aquella coseta que has creat.

Como el movimiento de personal en un laboratorio acostumbra a ser como el de Estació de Sants en hora punta, ha habido muchos compañeros con los que hemos compartido tiempo de nuestras respectivas tesis, aunque ellos han partido antes. Ellos son: Dani, una de las personas más brillantes que he conocido, sin embargo, su mayor virtud es la modestia, humildad y el altruismo, yo espero decir algún día a mis nietos que estuve en el mismo laboratorio que el Dr. del Toro. Noelia, un ejemplo de superación, trabajo y constancia; una persona con la cual siempre me he sentido muy a gusto por las buenas vibraciones que emana. Paola, mi compañera de master junto con la 'mone' (no nos hemos reído ni nada, eh), una gran compañera de laboratorio, y aunque ella crea lo contrario, siempre te recibe con una energía positiva que te alegra el día. Y si habló de Paola, tengo que hablar de aquello que siempre sale al lado suyo en las fotos de las cenas.....la Ingrid!! Me gusta que seas culé y de Sarriá (St.Gervasi no existe), pero más que defiendas el gran juego y poderío de la 'roja'...ole tu, ole tu!! Frank, mi gran maestro en la microscopia, gracias por tus enseñanzas y hacerme concebir la microscopia como un arte y no como una ciencia; con pocas palabras has dicho mucho, un abrazo amigo. 'Mi Inesita', Oye, que ha llegado el día, tía.....te acuerdas cuando pasaba la mopa por la poyata?, jajajaj. Suerte que has estado tú por aquí. Has sido como esa 'hermana mayor' a la cual podías pedirle consejo, que te enseñara a hacer alguna técnica, irte a hacer unas cañas y sobretodo REIRTE MUCHO!! (que jodía!). Fuiste una guía, y modelo a seguir, dentro del laboratorio. Todo este tiempo se te ha echado de menos, aunque siempre habrá un rinconcito en el que tú estás.

Aunque pueda parecerlo, no todo lo bueno se ha ido, actualmente quedan buenas 'perlas' en el laboratorio que hacen que el ir cada día a trabajar sea mucho más fácil, llevadero y que tengas agujetas en las abdominales de tanto reír. La Bet, no he conegut persona més disposada a ajudar als altres, les teves reflexions sempre m'ajuden a veure les coses des d'un altre punt de vista, el teu ús del 'refranero español' em fa riure molt i la teva manera de concebre la ciència com una forma de vida, és única i admirable. L'Albert, "la carabina de Sant Pol" una persona per la qual sento gran admiració en el terreny professional, però encara més en l'àmbit personal, ets un gran amic, i m'ho demostres cada dia, gràcies. Raquel: hay personas con las que conectas a la primera y tu has sido una de ellas, contigo siempre ha sido todo muy fácil y hemos compartido muchos momentos buenos fuera del laboratorio, gracias. Canicosa power! Cristina, entramos en el laboratorio a la vez y todavía estamos por aquí dando guerra, gracias por todos los momentos 'folkloricos apañoles', los dos tenemos ese 'punto de tierra dentro charneguil' que hace que la comunicación entre los dos sea cojonuda.

Ana López, gracias por transmitir esa paz, esa bondad y dulzura ilimitadas, además de esas miradas que dicen mucho más que las palabras. Ana Saavedra,..... que sería del laboratorio sin ti? y el mundo? Eres un ejemplo del trabajo bien hecho y de paciencia, sino existieras tendríamos que inventarte. Serás una gran mami. Laura: tens pessigolles? una tia que és tot optimisme i bon rollo, i encara que sigui la típica 'grupí' de Love of Lesbian, me l'estimo molt. Olga, nuestra 'superbilbaína', a ver cuando me invitas a las jaiak, gracias por ser así, un besazo.

La Laia: Ets una companya de laboratori ideal, sempre que t'he demanat ajuda me l'has donada de forma incondicional. Ets una crack i una carranta (la teva evolució és acollonant), i sota aquesta carcassa seria que portes, hi ha una persona molt maca i més divertida. Henry, es el paradigma de protagonista de novela negra, pisadas que se oyen desde la letanía, gran poder analítico y detectivesco, un humor negro de calidad suprema y aunque te acaba metiendo en algún 'embolao' tiene ese punto entrañable que te hace inevitable enviarlo a la mierda ;). La Mar,.....si tanco els ulls i em diuen que pensi en la paraula 'felicitat' la imatge que surt és la Mar. D'aquelles persones vitalista que és com el sol, irradia tanta energia (positiva) que el millor que pots fer és estar a prop d'ella (e una mujé dinna d'admirá). A més, es complementa amb un gran fitxatge, l'electrofisiòleg Gerard, un catxondo.....però menges poc, col•lega. El Adri (Antoine): poques vegades havia trobat un alter-ego humorístic, però sens dubte tu n'ets un, xaval. Ets un catxondo mental, i la veritat és que des de que tu vas arribar, amb la teva companyia, el dia a dia és molt més fàcil i divertit. Gràcies per ser com ets (ander?.....grifo). La Marta: una persona amb molta empena a la feina, a més, és la companya ideal per anar a fer unes canyes, llàstima que jo ja em vagi a dormir a l'hora de les gallines (em dones cartes?). Verónica y Nico: sois una pareja encantadora, gracias por abrirnos las puertas de casa y poder conocer vuestra encantadora familia, nos vemos en futuras citas con los pequeñajos. Miriam: muchas gracias por toda la ayuda que me has prestado para mejorar mis 'maxis' y purificaciones de proteína, te debo muchas. La Carla (la Cal-li), una currela impressionant que te un somriure maquíssim i una companya de poyata una mica "invasiva" (recorda, tot de Huelva, jejej). L'Alex: gràcies per tota l'ajuda amb el cultius primaris, chavalote. Por último, el mangurrian mayor del reino Juanma. Que tio! En el poco tiempo que nos conocemos hemos pasado de tener conversaciones en las que arreglábamos el mundo a llorar de la risa, aquellos que te conocen saben que eres un gran tipo. Gracias por toda la ayuda, bizcoche.

Agradecer también la ayuda de gente con la que he tenido menos trato, pero que están ahí como Josep, Mónica, Lidia y Ana Boronat.

Toda la gente de los servicios técnicos de la Facultad a los cuales he acudido y me han ayudado muchísimo: Pep Marimon, Ameri, Maria Calvo, Anna Lledó, Anna Bosch, Cristina Sánchez.

Tota la gent de la unitat de Biologia Cel·lular, la qual en un moment o altre m'ha ajudat amb maquinaria del seu laboratori o deixat aliquotes d'anticossos o reactius: Oriol Bachs, Neus Agell, Montse Jaumot (gràcies pel protocol de PPL), Eulalia Rius, Albert Pol, Ciscu Tebar, Maite, Carles Enrich.....i molts altres.

Voldria agrair al Jordi perquè sempre que he necessitat la seva ajuda, la porta del seu despatx sempre ha estat oberta. També volia agrair-li el fet de tenir tot un equip d'investigadors i grup humà de primera línia al laboratori. Per últim, reconèixer-li que tot allò que hi ha al laboratori (utilitzat per fer aquesta tesi) és gràcies a molta feina feta anteriorment.

No podia oblidar-me de: en Pep, gràcies per la teva ajuda, i el teu humor negre bastant depurat; l'Esther, gràcies per aquelles magnífiques tertúlies en els dinars i esmorzars, on reiem molt; i la Silvia, a la qual haig d'agrair-li tota l'ajuda rebuda per part seva en el laboratori. Sempre que t'he necessitat, estaves disposada a ajudar-me, moltes gràcies per tot.

A Nuria y Carme por su impagable ayuda con todos los trámites y la burrocracia a lo largo de todos estos años; y últimamente a esta ayuda también se ha sumado Eva, muchas gracias.

De la època en que feiem el màster, volia enrecordar-me del Javi Ortega, la Neus i el Jorge Galino, companys amb els quals vaig gaudir de moments molt bons.

A lo largo de esta tesis hemos colaborado con diversos laboratorios a los que quiero agradecer el hecho de poder aprender de todos ellos: Ernest Giralt, Raquel Ibáñez (gràcies per tota l'ajuda amb la TEER), Albertus deBoer, Patricia Urban y Xavi Fernández-Busquets, Arturo López Quintela, Amilcar Labarta (gracias por todas las gestiones hechas), Mario Montes, Estela, Dolores Ludevid, Maruja Estévez y Josep Samitier, Isabel Fabregat y su equipo (por proporcionarme material, consejos profesionales y personales, mil gracias!!). Piero Crespo y todo su grupo: Adán, Javi, Ana, Maxi-Paula, Mini-Paula, Lorena Berta, Fer). Agradeceremos a todos por acogerme tan bien en Santander y hacer que me sintiera como en casa: los mini-bocatas de Chus, las indigestiones de Maxi-Paula, los relojes de contrabando de Mini-Paula, la risa contagiosa de tito Pinto (un beso Ana y Debrí) y los focos de KDEL (¿?) de Ana. Javi, menos mal que tuve la suerte de conocerte luego, artista. Las puertas de casa están abiertas para todos vosotros, sois gente cojonuda!! Volia finalitzar anomenant a en Roger Prades, el meu company de la BBB, tot aquest temps he pogut gaudir de treballar juntament amb tu al laboratori, però el millor sens dubte, ha sigut conèixer-te personalment i adonar-me'n de que ets un gran amic. Em deus una birra al Flabiol. Gràcies per tot company

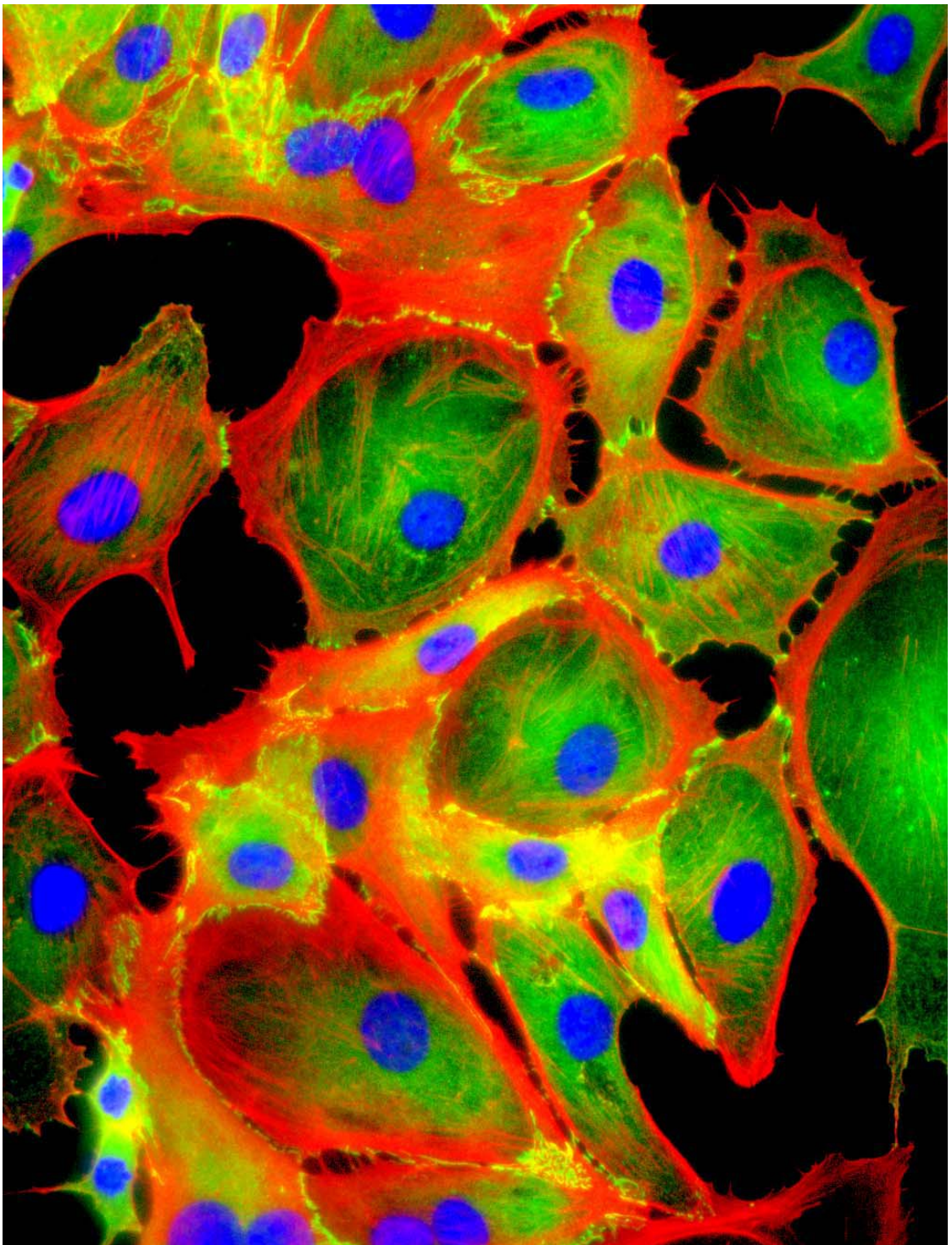
Además de vida en el laboratorio también habéis sido mucho los que me habéis apoyado fuera de él durante estos años. Los inseparables amigos de la carrera (Biotecs): Anna, Laia, Marga, Joana, Nina, Aida, Isa, Gabri, Marta, Armand, Dani, Quin, Juanjo, Bernie y Txell; doctores, pre-doctores, papás y mamás vosotros conocéis bien el transcurso de una tesis, gracias por vuestro apoyo. Mi grupo musical fetiche, OLAF: Francis, Rick, Dani y Raimon, todavía me acuerdo de aquel concierto en calzoncillos del Opium, jajajaja. Esas horas de ensayo me ayudaban a desconectar un montón; merci nois. Jonne ja Ninni: Kiitos kaikista, halata ystäviä. Los inseparables compañeros de vestuario, cenas, juergas y derrotas del CF KRILL: Geri, Bruno, Iñaki, Santcli, Soler-Cabot, Steen e Irune, Masllu, Montes, Cristian, Julio, Roca, Agus, Marín, Guille, David, Manzano, Alex Matas, Andy, Manolo, Migue, Txiki, Dani, Migui, Carlos Quílez, Ricardo, Pitu, Jose Pedro, Jaime, Castillo y Maite.....y todos los que habéis pasado por el equipo durante todos estos años. Luego están los 'amiguetes' de toda la vida (PENYA DEL ROBLE – CULEBRAS): Guille, Ingi, Alberto, Alex, Gonzalo, Corro, Isamat, Nachi, Carulla, Isaac, Robert, Annaïs, Irene, Anna, Cris, Miriam, Sergio y Pinós; muchas gracias por aguantarme!! No me olvidaba de Julio y Quin, los dos habéis sido, sois y seréis dos pilares muy importantes en mi vida, gracias por ser así.

Para mi la familia es un eje muy importante de mi vida, por eso quiero agradecer a: la Familia Piñon-Peña (Jordi, Silvia, Cuca, Pakita, Mar, Tete, tío Jose Antonio, tía María) por acogerme como uno más y todos esos buenos momentos que hemos pasado juntos. La familia Zudaire-Sánchez (tía Asún, mi segunda madre, tío Cesar, Cristina, Julia y la insuperable iaia Gela), aunque estemos a 500 km de distancia, os tengo siempre muy cerca. La Familia Selva-Prieto (tío Julio, Elena, tía Pili, tía Conchi, Vicente, iaia Amparo, tía Quisi) por esas magníficas comidas familiares en las que no paramos de contar chistes y acabamos cantando el himno a León ,jajaja. También quisiera acordarme del iaio Julio, te fuiste a mitad de esta tesis y no pudiste verla acabar, gracias por todas aquellas mañanas en el zoo, eras un grande.

Finalmente estáis vosotros, los que me sufrís cada día 'en casa'. A mis padres quería agradecerles el enseñarme a luchar por aquello que se quiere, a que las cosas en esta vida si se hacen con cariño y amor salen solas, y por creer y confiar en mi. Todo lo que soy, os lo debo a vosotros. A Albi, decirle que además de mi hermano, eres un gran amigo, siempre estás allí y encima tienes que aguantar los sermones de 'hermano tonto mayor'. De mayor quiero ser un poco más como tu. Gracias chavalote.

Mi motor de arranque son mis dos mujeres, sin ellas no podría levantarme cada día. Paula: no se cuando leerás esto (si es que todavía queda alguna copia por casa), pero que sepas que tu has participado muy activamente en la recta final de esta tesis. Desde que naciste tú (hace 11 meses), todo tiene un sentido y el mundo tiene otros olores y colores, eres lo mejor que he hecho en la vida y me has dado mucha fuerza. También quería disculparme por todos aquellos baños y ratos en el cuarto de los juguetes que me he perdido acabando esta tesis. Todo lo que hago, lo hago por ti.

Fa temps que vaig començar una aventura en la qual cada dia em passen coses noves i increïbles. En aquesta aventura tinc una companya que es diu Vanesa. En aquesta aventura va aparèixer un dia la possibilitat de fer una tesi, i aquí ens vam ficar els dos. Tu des del primer moment em vas agafar fort i em vas ajudar a caminar. Quan jo no podia més, m'acariciaves i em donaves el teu alè per a què pogués seguir endavant. Quan volia abandonar m'abraçaves i amb la teva energia aconseguia continuar. Cada dia que passa, penso en la sort que tinc de que estiguis al meu costat. Com deia la cançó, "sin ti, no soy nada".



ÍNDICE

ABREVIATURAS	23
I. - INTRODUCCIÓN	27
1. El alcoholismo fetal	29
1.1. Desórdenes Relacionados con el Alcoholismo Fetal (DRAF).....	32
1.2. Síndrome Alcohólico Fetal (SAF)	35
1.3. Potenciales farmacoterapias frente a los DRAF	38
1.4. Teratogénesis del etanol en modelos experimentales	40
2. Los astrocitos y desarrollo del Sistema Nervioso Central	43
2.1. Ontogenia de las células astrogliales.....	45
2.2. Tipos de astroglia.....	46
2.3 Funciones de la astroglia	48
3. Los filamentos de actina	54
3.1. La molécula de actina	54
3.2. Proceso de polimerización de actina	55
3.3. Proteínas de unión a actina (ABPs).....	57
3.4. Nucleadores de actina	58
4. Las RhoGTPasas	59
4.1. Dominios funcionales	60
4.2. Localización subcelular	61
4.3. Ciclo funcional de las RhoGTPasas.....	62
4.4. Funciones biológicas.....	65
5. Los fosfoinosítidos.....	72
5.1. Tipos de fosfoinosítidos	73
5.2. Localización, metabolismo y función de los fosfoinosítidos.....	74
5.3. Los fosfoinosítidos en el citoesqueleto de actina	75
II. - OBJETIVOS	81
III. - RESULTADOS	85
PRIMER TRABAJO: “Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol.”	87

SEGUNDO TRABAJO: “Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements.”	99
TERCER TRABAJO: “Silver sub-nanoclusters electrocatalyze ethanol oxidation and provide protection against ethanol toxicity in cultured mammalian cells.”	135
IV. - DISCUSIÓN	157
1. Mecanismos moleculares por los cuales el etanol afecta la organización del citoesqueleto de actina	160
1.1. Alteración de la transducción de señales mediada por RhoA	161
1.2. Alcohol y fosfoinosítidos	165
2. Agentes citoprotectores y potenciales farmacoterapias frente al alcohol	167
2.1. Ácido lisofosfatídico	167
V. - CONCLUSIONES	171
VI. - BIBLIOGRAFÍA	175
VII. - ANEXOS	209
1. Producción de un modelo de BBB <i>in vitro</i>	211
1.1. Objetivo	211
1.2. Introducción	211
1.3. Resultados	215
1.4. Discusión	219
2. Resultados no publicados	221
2.1. Metabolización del etanol en los astrocitos	221
2.2. Actividades RhoGAP y RhoGEF en astrocitos expuestos a etanol	224
3. Material y métodos	226
3.2. Reactivos utilizados	226
3.3. Lista de anticuerpos utilizados	227
3.4. Lista de marcadores utilizados	228
3.5. Lista de plásmidos utilizados	229
3.6. Métodos utilizados	229
4. Bibliografía de los anexos	237

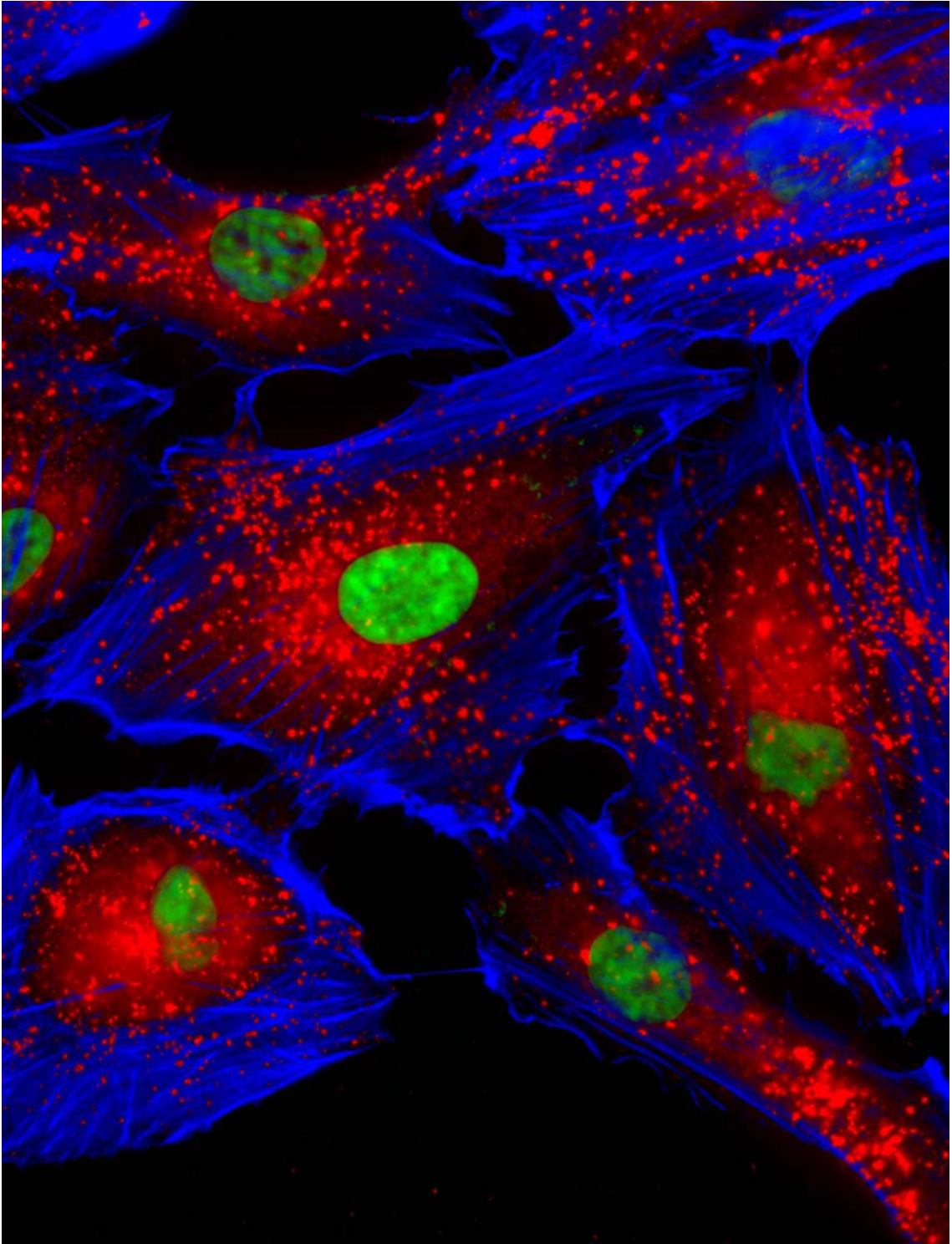
ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxi-triptamina
Abl	Abl tyrosine kinase / Quinasa de tirosinas Abl
ABPs	Actin binding proteins / Proteínas de unión a actina
ADF	Actin despolimerizing factor / Factor despolimerizante de actina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNF	Activity-dependent neurotrophic factor/ Factor neurotrófico dependiente de actividad
ADNF-12	Activity-dependent neurotrophic factor-12 / Factor-12 neurotrófico dependiente de actividad
ADNP	Activity-dependent neuroprotective protein / Proteína neuroprotectora dependiente de actividad
ADP	Adenosine Diphosphate / Adenosina difosfato
AgAQCs	Silver atomic quantum clusters / Clusters cuánticos de átomos de plata
ALDH2	Aldehído deshidrogenasa 2
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
AP180	Adaptor protein 180 / Proteína adaptadora 180
ARN	Ácido ribonucleico
Arp 2/3	Actin-related proteins 2 and 3 complex / Complejo de las proteínas relacionadas con actina 2 y 3
ATP	Adenosine triphosphate / Adenosina Trifosfato
BBB	Blood-brain barrier / Barrera hematoencefálica
BCEC	Brain capillary endothelial cells / Células endoteliales de capilares cerebrales
bFGF	Basic fibroblast growth factor / factor de crecimiento básico de fibroblasto
BSA	Bovine serum albumin / Albúmina bovina sérica
Cc	Concentración crítica
CdC42	Cell division cycle-42 protein / Proteína 42 del ciclo de división celular
CDPKII	Calmodulin-dependent protein kinase II / Proteína quinasa dependiente de calmodulina
CL	Cardiolipina
Cs	Concentración estándar
CSF	Cerebrospinal fluid / Líquido cefalorraquídeo
Cy	Cyanine / cianina

CYP2E1	Cytochrome P450 2E1 / Citocromo P450 2E1
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole /4',6-Diamidino-2-fenilindol
DH	Dbl homology / De homología a Dbl
DMEM	Dubelcco's modified eagle medium /Medio de águila modificado por Dubelcco
DRAF	Desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal
EtOH	Etanol
F-actina	Filamentous actin / Actina filamentosa
FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos grasos / Fatty acid ethyl esters
FAK	Focal adhesión kinase / Quinasa de adhesiones focales
FBS	Foetal bovine serum / Suero fetal bovino
GABA	Ácido γ -aminobutírico
G-actina	Globular actin / Actina globular
GAP	GTPase activating protein / Proteína activadora de la GTPasa
GDI	Guanine dissociation inhibitor / Inhibidor de disociación de guanina
GNDF	Glial derived neurotrophic factor / Factor neurotrófico derivado de la glia
GDP	Guanosine diphosphate / Guanosin difosfato
GEF	Guanine exchange factor / Factor intercambiador de guanina
GFAP	Glial fibrillar acidic protein / Proteína fibrilar ácida glial
GFP	Green fluorescent protein / Proteína fluorescente verde
GLUT1	Receptor de glucosa 1
GLUT3	Receptor de glucosa 3
GST	Glutathione-S-transferase / Glutation-S-transferasa
GTP	Guanosine triphosphate / Guanosin trifosfato
GTPasa	Guanosine trifosfatase /Guanosina trifosfatasa
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor/ Factor de crecimiento similar a EGF unido a heparina
HRP	Horseradish peroxidase / Peroxidasa de rábano
IGF1	Insulin-like growth factor 1 / factor de crecimiento insulínico 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor / Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1
IP	Inmunoprecipitación
L1-CAM	Neural cell adhesion molecule L1 / Molécula neural de adhesión celular L1
LDH5	Lactate dehydrogenase type 5 / Lactato deshidrogenasa tipo 5
LIF	Leukemia inhibitor factor / Factor inhibidor de leucemia

LMW-PTP	Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase/ Fosfatasa de tirosina de bajo peso molecular
LPA	Lysophosphatidic acid / Ácido lisofosfatídico
LtB	Latrunculina B
MAPK	Mitogen-activated protein kinase / Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCT	Monocarboxylase transporters / Transportadores de monocarboxilasa
MF	Microfilamentos de actina
MLC	Myosin Light Chain / Cadena ligera de la miosina
MLCK	Myosin Light Chain Kinase / Quinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Myosin Light Chain Phosphatase / Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
NGF	Nerve growth factor / Factor de crecimiento neuronal
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ exchangers / Intercambiadores de Na ⁺ /H ⁺
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid / Ácido N-metílico-D-aspártico
NRK	Normal rat kidney cells / Células normales de riñón de rata
N-WASP	Neural WASP / WASP neural
O-2A	Oligodendrocito tipo 2 astrocito
OPHN-1	Oligonephrin-1 / Oligonefrina-1
p190A	p190RhoGAP
p190B	p190-B-RhoGAP
PA	Phosphatidic acid / Ácido fosfatídico
PAK	p21-activated Protein Kinase / Quinasa activada por p21
PBD	PAK1 binding domain / Dominio de unión a PAK1
PBS	Phosphate buffer saline / Tampón fosfato salino
PC	Phosphatidilcoline / Fosfatidilcolina
PE	Phosphatidiletanolamina / Fosfatidiletanolamina
PGK	Phosphoglycerate kinase / Fosfoglicerato quinasa
PH	Plekstrin homology / De homología a plekstrina
PI	Fosfatidilinositol
PIP	Fosfatidilinositol monofosfato
PIP₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PIPK	Phosphatidilinositol kinase / Quinasa de fosfatidilinositol
PKC	Protein Kinase C / Proteína quinasa C
PLD	Phospholipase D / Fosfolipasa D
PS	Phosphatidilserine / Fosafatidilserina
PTB	Phosphotyrosine binding domain / Dominio de unión a fosfotirosinas

PTEN	Phosphatase tensin homologue / Fosfatasa de homología a tensina
PTP20	Protein Tyrosine Phosphatase 20 / Proteína fosfatasa de tirosinas 20
PX	p47(phox) domain / Dominio p47(phox)
RA	Retinoic acid / Ácido retinoico
RBD	Rhoketin binding domain / Dominio de unión a Rhoketin
RE	Retículo endoplasmático
RHE	Reference hydrogen electrode / Electrodo de hidrógeno de referencia
Rho	Ras homology / Homóloga de Ras
ROCK	Rho kinase / Quinasa de Rho
SAF	Síndrome alcohólico fetal
SH2	Src homology 2 / Homólogo a Src 2
SH3	Src homology 3 / Homólogo a Src 3
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
SOD	Superóxido dismutasa
Src	Src (sarcoma) tyrosine kinase / Quinasa de tirosinas Src (sarcoma)
Stp	Staurosporine / Estaurosporina
TEER	Trans-endothelial electrical resistance / Resistencia eléctrica transendotelial
TGF	Tumor growth factor / Factor de crecimiento tumoral
TNF	Tumor necrosis factor / Factor de necrosis tumoral
TRITC	Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate / Isocianato de Tetrametil Rodamina
UV	Ultravioleta
WASP	Wiscott-Aldrich syndrome protein / Proteína del síndrome de Wiscott-Aldrich
WAVE	WASP family Verprolin-homologous protein / WASP homóloga a verprolina
WB	Western Blot / Inmunotransferencia



I. - INTRODUCCIÓN

1. El alcoholismo fetal

La exposición prenatal a alcohol aumenta los riesgos de sufrir alteraciones físicas, cognitivas y de comportamiento en el feto (*U.S. Department of Health 2008*). Diversos estudios muestran una correlación entre el consumo de alcohol durante el embarazo y el riesgo a padecer embarazos a término (Albertsen y col., 2004). Actualmente, no existen estudios poblacionales en España que nos indiquen la tasa de consumo de alcohol durante el embarazo. Por tanto, para obtener una percepción real del hábito de consumo de alcohol durante el embarazo debemos utilizar los datos del *National Survey on Drug Use and Health (NSDUH)*. Este informe se publicó en 2008 y se centra en la población estadounidense, la cual hasta cierto punto es comparable con la española. Según los datos del estudio, entre los años 2005-2006, un 12 % de las madres embarazadas (comprendidas entre 15 y 44 años de edad) admitían haber consumido alcohol durante el último mes (*Office of Applied Studies, 2007*). Lamentablemente, el consumo de alcohol en mujeres embarazadas no ha descendido significativamente en los últimos años (Figura 1), ni tampoco lo ha hecho en otros grupos poblacionales como madres con hijos menores de 12 meses, o mujeres no embarazadas (Figura 1).

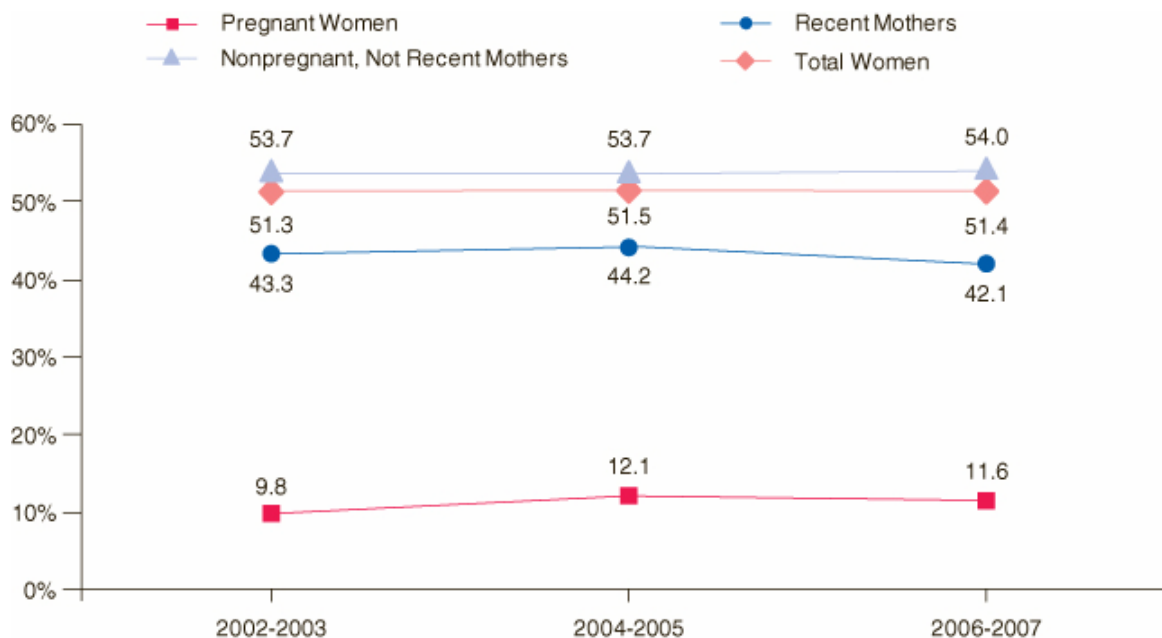


Figura 1. Tendencias en el consumo de alcohol durante el último mes en mujeres de entre 15 y 44 años. Los datos del estudio nos indican que el consumo de alcohol no ha variado significativamente en ninguno de los grupos poblacionales estudiados, del 2002 hasta el 2007. Figura obtenida de NSDUH, 2008.

En mujeres embarazadas, la franja de edad que más alcohol consumió durante el último mes era entre los 15-17 años (un 15,8 %, Figura 2). El consumo de alcohol durante el embarazo siempre se había asociado a un bajo nivel cultural y/o pertenencia a grupos marginales. Sin embargo, se observó que las mujeres que más alcohol consumían durante el embarazo eran tituladas universitarias (15,8 %) y con los ingresos familiares más elevados (16,3 %, Figura 2).

Demographic Characteristic	Pregnancy Status		
	Pregnant	Recent Mothers	Nonpregnant, Not Recent Mothers
Age			
15 to 17	15.8	26.8	25.3
18 to 25	9.8	41.2	62.2
26 to 44	12.5	42.9	55.7
Race/Ethnicity**			
White	14.5	52.1	61.1
Black	15.7	31.9	44.6
Hispanic	4.1	22.9	41.6
Education Status***			
Less Than High School	8.9	28.1	37.7
High School Graduate	8.3	35.7	51.8
Some College	11.7	45.6	60.9
College Graduate	15.8	53.7	69.7
Income			
Less Than \$20,000	11.7	30.9	47.3
\$20,000 to \$49,999	9.2	38.3	50.7
\$50,000 to \$74,999	9.5	47.1	55.2
\$75,000 or Higher	16.3	54.4	62.2

Figura 2. Porcentajes del consumo de alcohol en el último mes en mujeres de entre 15 y 44 años. Las mujeres embarazadas más jóvenes, con más estudios y con los ingresos más elevados son aquellos que más alcohol consumieron durante el último mes. Figura obtenida de NSDUH, 2008.

El consumo de alcohol en las mujeres embarazadas era de media 5 días/mes. En este tiempo consumían unas 2,4 bebidas/día, lo que equivale a 12 bebidas/mes. Las embarazadas más jóvenes (entre 15 y 25 años) consumían, sin embargo una media de 3,6 bebidas/día (18 bebidas/mes, Figura 3), mientras que las mujeres entre 26 y 44 años solamente consumían unas 1,7 bebidas/día (8 bebidas/mes, Figura 3). Contrariamente a los datos de consumo total durante el último mes (Figura 2), este estudio revela que el número de bebidas consumidas por día disminuía a mayor nivel educativo e ingresos familiares (Figura 3).

Demographic Characteristic	Pregnancy Status		
	Pregnant	Recent Mothers	Nonpregnant, Not Recent Mothers
Age			
15 to 17	3.6	*	4.1
18 to 25	3.6	3.4	3.6
26 to 44	1.7	2.0	2.6
Race/Ethnicity**			
White	1.9	2.6	3.0
Black	3.1	1.9	2.5
Hispanic	4.6	2.5	3.1
Education Status***			
Less Than High School	4.5	3.5	4.1
High School Graduate	2.6	2.9	3.4
Some College	2.1	2.7	3.0
College Graduate	1.6	1.7	2.2
Income			
Less Than \$20,000	3.7	3.1	3.7
\$20,000 to \$49,999	2.2	2.8	3.2
\$50,000 to \$74,999	2.3	2.0	2.8
\$75,000 or Higher	1.6	2.1	2.5

Figura 3. Media de bebidas alcohólicas consumidas al día durante el último mes en mujeres entre 15 y 44 años. Aquellas mujeres embarazadas que más alcohol consumían al día durante el último mes eran aquellas con menos estudios, menos ingresos y más jóvenes. Figura obtenida de NSDUH, 2008.

En España, existen iniciativas como la intervención en el ámbito psicoeducativo del Programa ALFIL. Éste tiene como objetivo general disminuir factores de riesgo y potenciar factores de protección en los hijos de alcohólicos y en sus familias, con el fin de reducir la probabilidad de que los menores de estas familias desarrollen problemas importantes relacionados, directa o indirectamente, con el consumo de drogas (Díaz y col., 2008). Sin embargo, solamente se disponen de datos poblacionales aislados que estiman que entorno a un 25% de las mujeres embarazadas siguen consumiendo alcohol durante el embarazo (Anderson y Baumberg, 2006) y además son consumidoras de riesgo, pudiendo llegar a ingerir excesivas dosis de alcohol (Rubio y Santo-Domingo, 2000; Sánchez y col., 2000).

Ciertas evidencias indican que el consumo de alcohol a dosis bajas (< 7 bebidas/semana o < 3 bebidas/día) durante el embarazo pueden provocar efectos adversos en el feto (Bearer y col., 2001). Por ello, una cantidad “segura” de alcohol no puede determinarse, siendo la abstinencia lo más recomendable. Además, como parte del alcohol consumido puede ser transmitido a través de la leche materna, también se recomienda no consumir alcohol durante la lactancia. En definitiva, el índice de consumo de alcohol en mujeres embarazadas obtenido mediante estudios poblacionales es de gran ayuda ya que muestra el alcance del problema e identifica los grupos de riesgo, lo cual permite desarrollar y diseñar políticas de prevención y educación.

1.1. Desórdenes Relacionados con el Alcoholismo Fetal (DRAF)

El alcohol (etanol) aún a dosis bajas, y especialmente consumido durante el primer trimestre del embarazo aumenta el riesgo de padecer abortos espontáneos, partos prematuros, retraso en el crecimiento intrauterino y bajo peso del feto al nacer (Abel, 1997; Windham y col., 1997; Bradley y col., 1998; Albertsen y col., 2004; Rehm y col., 2004), y una reducción en la producción de leche materna (Mennella, 2001). Como agente teratógeno afecta al desarrollo embrionario o fetal, alterando la expresión génica, induciendo muerte celular programada, perturbando la proliferación y migración celular y histogénesis y modificando la síntesis y/o función de proteínas o ácidos nucleicos (Polifka y Friedman, 2002). La exposición prenatal a etanol es causa destacada y prevenible de anomalías en el desarrollo del cerebro, como retraso mental y desórdenes en el desarrollo neuronal (*American Academy of Pediatrics*, 2000). El etanol atraviesa la barrera hematoencefálica y placentaria, por lo que cualquier cantidad del mismo que sea ingerida durante el embarazo supone un riesgo muy importante para el feto. La consecuencia más conocida es el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF; Jones y Smith, 1973), caracterizado por deficiencias pre- y postnatales en el crecimiento, anomalías craneales y faciales, y evidencias de disfunciones en el sistema nervioso central (SNC). Actualmente, el SAF es considerado una de las causas más importantes de discapacidad intelectual y problemas en el comportamiento en diversos países (Streissguth y col., 1991; Alati y col., 2006; Autti-Rämö y col., 2006; Ceccanti y col., 2007; Spohr y col., 2007). Sin embargo, durante los últimos 30 años, se ha observado que el SAF no es la única consecuencia resultante de la exposición prenatal a etanol y que sus efectos son un conjunto de anomalías físicas y deficiencias cognitivas. El término “desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal (DRAF)” engloba todo este conjunto de efectos variables y no diagnosticables de forma evidente (Barr y Streissguth, 2001).

La exposición prenatal a etanol está asociada con déficits neuropsicológicos que repercuten en la inteligencia, la memoria (Mattson y Roebuck, 2002; Roebuck-Spencer y Mattson, 2004), el lenguaje, la atención, el aprendizaje (Howell y col., 2006), las habilidades óptico-espaciales (Mattson y col., 1996), funciones ejecutoras, las habilidades motoras y la adaptación social (Mattson y Riley, 1998). Todo ello sugiere la existencia de anormalidades en la ruta frontal-subcortical y un mayor daño en el lóbulo izquierdo (Guerra y col., 2009). De hecho, la exposición a etanol provoca alteraciones en la remodelación axonal y en la incorporación de neuronas al giro dentado, ambos procesos involucrados en el aprendizaje y la memoria (He y col., 2005). La falta de atención es muy frecuente en estos individuos, siendo los desórdenes de déficit de atención/hiperactividad (ADHD) la patología psiquiátrica más diagnosticada en

individuos DRAF (Fryer y col., 2007). Finalmente, varios estudios describen deficiencias en la función ejecutora en individuos con DRAF que implica problemas en la inhibición de respuesta, planificación, formación de conceptos, vulnerabilidad frente a las adversidades y fluidez del lenguaje verbal y no verbal (Kodituwakku y col., 1995; Mattson y col., 1999; Lupton y col., 2004).

Se estima que entre un 1% y 3% de todos los niños del mundo sufren DRAF (Sampson y col., 1997; May y Gossage, 2001).

1.1.1. Alteraciones en la arquitectura cerebral

Los efectos del etanol en el desarrollo cerebral no son uniformes e incluso ciertas poblaciones celulares son más vulnerables que otras. Datos clínicos y experimentales indican que los individuos afectados por la exposición fetal a etanol padecen una reducción del tamaño cerebral (Johnson y col., 1996). Concretamente, se describen disminuciones de volumen en el lóbulo parietal (Archibald y col., 2001), partes del lóbulo frontal (Sowell y col., 2002) y en el cerebelo (Sowell y col., 1996; Autti-Rämö y col., 2002; O'Hare y col., 2005), así como alteraciones en el cuerpo calloso, lo cual se ha asociado a déficits neuropsicológicos (Sowell y col., 2001; Bookstein y col., 2002; Coles y col., 2002). Dado que el cerebelo es el responsable de la ejecución motora (postura, equilibrio y coordinación), estas alteraciones estructurales podrían explicar las deficiencias motoras observadas en individuos DRAF (Roebuck y col., 1998). El cerebelo también está implicado en la regulación de la atención y la respuesta condicionada, tareas que se ven alteradas en individuos SAF (Coffin y col., 2005). Otra zona que ve disminuida su volumen es la de los ganglios basales, concretamente el núcleo caudado (Archibald y col., 2001), el cual se ha relacionado con déficits en la ejecución de acciones, atención e inhibición de respuesta (Mattson y col., 1996). Por otro lado, en las regiones corticales se ha observado que los individuos DRAF tienen una distribución y densidades diferentes de las sustancias blanca y gris (Archibald y col., 2001), lo que guarda relación con la reducción de volumen de la región parietal (Sowell y col., 2002). Todas estas alteraciones estructurales tienen consecuencias funcionales y metabólicas en el cerebro. Así se ha descrito en individuos con DRAF una reducción en el metabolismo de la glucosa en el tálamo (Clark y col., 2000), alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (Riikonen y col., 1999; Bhatara y col., 2002) y en las vías corticales serotoninérgicas y estriatales dopaminérgicas (Riikonen y col., 2005). Además, mostraban una descompensación de actividad, incrementada en las regiones inferior y media de la corteza frontal (Malisza y col., 2005) y disminuida en el núcleo caudado (Fryer y col., 2007b).

1.1.2. Ventana temporal crítica de la exposición a etanol

Existen diversos factores biológicos y ambientales que influyen en los efectos del etanol sobre el desarrollo cerebral. Estos son: la dosis de etanol, el patrón y momento de exposición durante el desarrollo, la base genética de los individuos, la nutrición materna, la edad de la madre, el *estatus* socioeconómico y las reacciones aditivas o sinérgicas con otras sustancias de abuso. Aunque principalmente son los niveles de etanol que llegan al feto y la duración de la exposición lo que define el tipo y alcance del daño producido (Maier y col., 1996). Por eso no todos los individuos expuestos a concentraciones similares de etanol durante la gestación sufren el mismo daño. Por ejemplo, la dismorfología facial (característica del SAF) y otras malformaciones (Figura 4) suelen aparecer cuando se ha estado expuesto a dosis muy elevadas de etanol durante la etapa embrionaria (0-8 semanas) (Sulik, 2005). Estudios en humanos han demostrado que la exposición crónica o extremadamente aguda a etanol en las etapas tempranas de la embriogénesis (tercera semana de gestación) provoca una mayor incidencia de defectos craneales y deficiencias mentales (Ernhart y col., 1987). Otro periodo crítico del desarrollo es la etapa en la que se produce la proliferación y migración de las células neuroepiteliales (entre las semanas 8-20 en humanos, y entre los días 12 y 21 en ratas). En esta etapa, el etanol altera la migración y la proliferación celulares provocando una disminución neuronal y glial en el neocórtex, hipocampo y núcleo sensorial (Renau-Piqueras y col., 1989; Gressens y col., 1992; Miller y col., 1995a, 1995b; Rubert y col., 2006). Por último, el etanol también interfiere en la fase de crecimiento cerebral masivo (neonatal en ratas y durante el tercer trimestre de gestación en humanos). Es un período caracterizado por la gliogénesis, sinaptogénesis y el desarrollo del cerebelo, del hipocampo y del córtex. En esta etapa la exposición a etanol puede provocar microcefalia, pérdida neuronal en el hipocampo y cerebelo (Goodlett y Lundahl, 1996; Dikranian y col., 2005), alteraciones en la sinaptogénesis y la gliogénesis (Guerra y Renau-Piqueras, 1997), apoptosis (Ikonomidou y col., 2000), así como déficits en el aprendizaje, la memoria y disfunciones en el comportamiento a largo plazo (Wozniak y col. 2004; Popovic y col. 2006). Por lo tanto, los niveles de etanol que llegan al cerebro fetal y el momento del desarrollo en el que se expone determinarán el grado de afectación en la ontogenia cerebral.

Otro factor relevante es el genotipo materno y fetal (Polifka y Friedman, 2002). En el caso del etanol se han descrito variaciones genéticas en las enzimas encargadas de regular su metabolización (ADH y CYP2E1) en diferentes grupos poblacionales (McCarver, 2001).

1.1.3. Posibles mecanismos moleculares implicados

Determinar los lugares de acción responsables de la teratogénesis del etanol requiere el estudio de las cascadas de señalización implicadas en el desarrollo del cerebro. Un creciente número de mecanismos han sido identificados como potenciales responsables del fenotipo de los individuos con DRAF, los cuales se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- 1.- Alteración en la regulación de la expresión génica: disminución de la señalización del ácido retinoico y efectos en otros factores de transcripción (Deltour y col., 1996; Peng y col., 2004).
- 2.- Interferencia con la señalización de factores de crecimiento u otras rutas de señalización: alteraciones en la diferenciación, proliferación y migración de células madre neurales (Luo y Miller, 1996; Bonthius y col., 2004; Ge y col., 2004).
- 3.- Daño y muerte celular: inducción de la apoptosis (Young y col., 2005), estrés oxidativo (Henderson y col., 1999) y excitotoxicidad glutamatérgica inducida por la abstinencia a etanol (Thomas y col., 2004).
- 4.- Alteración de las uniones intercelulares: inhibición de la función de la molécula de adhesión L1 (L1-CAM) (Bearer y col., 1999).
- 5.- Alteración del aporte energético: modificaciones en el uso y captación de la glucosa (Miller y Dow-Edwards, 1988; Snyder y col., 1992), supresión de la síntesis proteica y de ADN (Shibley y Pennington, 1997).
- 6.- Desregulación del desarrollo celular: ciclo celular alterado, neurogénesis y gliogénesis afectada, y descoordinación en la proliferación y migración celulares, crecimiento axonal, sinaptogénesis y proceso de mielinización (Phillips, 1989; Miller, 1992; Miller y Robertson, 1993; Lindsley y col., 2003; Zhou y col., 2005)
- 7.- Causas 'adquiridas' al daño: alteración de factores intrauterinos (Randall y col., 1995), hipoxia/isquemia (Altura y col., 1982) y producción de acetaldehído (Holownia y col., 1996).

1.2. Síndrome Alcohólico Fetal (SAF)

El SAF es el trastorno relacionado con el alcoholismo fetal (dentro de los DRAF) más evidente y fácil de diagnosticar. Se caracteriza por la presencia de rasgos faciales anormales y por problemas en el desarrollo del SNC de los recién nacidos. El SAF es el tercer tipo de retraso

mental más frecuente por detrás de los síndromes del cromosoma X- frágil y de Down, presentando una incidencia de 2 de cada 1000 nacimientos en Europa y E.E.U.U. (May y Gossage, 2001). El coeficiente intelectual medio en individuos con SAF es de 70 (Mattson y Riley, 1998) y alrededor de 85,9 en individuos con DRAF (Mukherjee y col., 2006).

El SAF se encuentra en el extremo de un acúmulo de efectos en el feto debido al consumo elevado y persistente de etanol por parte de la madre gestante. Clínicamente, por lo general se ven afectadas tres áreas: 1) retraso en el crecimiento a nivel pre- y postnatal, 2) daños permanentes e irreversibles en el SNC, y 3) anomalías faciales y craneales, todo ello acompañado de malformaciones en otros órganos y aparatos (Figura 4).

<p>Crecimiento:</p> <ul style="list-style-type: none"> • hipotonía • retraso crecimiento prenatal y postnatal • disminución del tejido adiposo
<p>Habilidades cognitivas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • hiperactividad. • retraso psicomotor/mental. • hipotonía. • alteración motora fina/coordiación. • problemas de lenguaje. • problemas comportamiento/psicosociales
<p>Alteraciones faciales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • microcefalia. • hendiduras palpebrales pequeñas. • ptosis (caída del párpado superior). • retrognatía (posición del maxilar inferior por detrás de la línea de la frente (lactante)). • hipoplasia maxilar. • labio superior fino. • nariz corta antevertida. • micrognatía (adolescente)
<p>Esqueleto:</p> <ul style="list-style-type: none"> • contracturas en flexión de articulaciones, dislocación congénita de la cadera. • defectos de posición del pie. • sinóstosis radiocubital. • alargamiento terminal de las falanges • hipoplasia de las uñas (manos y pies). • anomalías de la columna vertebral cervical. • anomalías de los surcos palmares. • pectum excavatum (hundimiento de la región esternal con o sin anomalías de la función respiratoria).
<p>Corazón:</p> <ul style="list-style-type: none"> • defecto del tabique interventricular. • defecto del tabique interauricular. • tetralogía de Fallot/ anomalías de grandes vasos.
<p>Otros:</p> <ul style="list-style-type: none"> • labio leporino y/o fisura palatina. • miopía. • estrabismo. • epicanthus (pliegue dérmico palpebral que puede ocultar parte del globo ocular). • maloclusión dental, sordera, orejas prominentes, etc.

Figura 4. Malformaciones y alteraciones propias del SAF. El SAF se caracteriza por retraso en el crecimiento pre y postnatal, trastornos funcionales en el SNC y alteraciones craneofaciales. Pero además, puede estar acompañado de malformaciones en otros órganos y aparatos. Modificado de *American Academy of Paediatrics*, 1993.

Las personas con SAF padecen, además de trastornos neuropsicológicos, alteraciones en la visión, audición, epilepsia, retraso mental o bajo coeficiente intelectual, insomnio y problemas de succión durante la lactancia. Todos estos trastornos descritos responden a los efectos teratogénicos del etanol durante la morfogénesis inicial del SNC. Entre las malformaciones que aparecen en el SAF se incluye la holoprosencefalia, patología en la que la región más rostral del encéfalo, el prosencéfalo, no se separa en dos mitades al comienzo de su formación. Si el grado de afectación es máximo, aparece la ciclopía como consecuencia de la ausencia de migración de los primordios de las vesículas ópticas (Cohen y Sulik, 1992; Johnston y Bronsky, 1995). Las anomalías craneofaciales características de estos individuos, incluyen cavidades oculares pequeñas, ptosis palpebral y estrabismo, nariz pequeña con puente nasal ancho y labio superior grande tal y como se observa en la Figura 5.

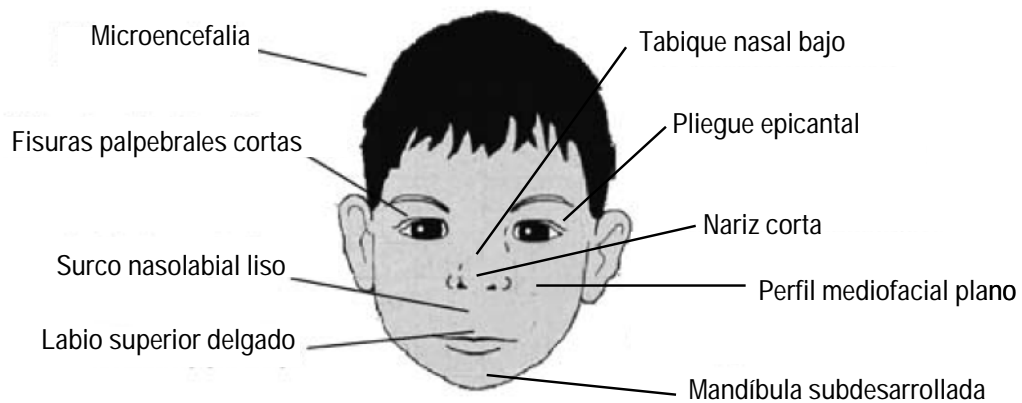


Figura 5. Alteraciones craneofaciales comúnmente observadas en los individuos que sufren SAF. Figura modificada de Riley y McGee, 2005 e imagen obtenida de http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2006/ee-05-2006/carteles/genetica_clinica_1.htm.

La etapa embriogénica del embarazo humano es considerada la más crítica y decisiva para la aparición de los rasgos más severos y característicos del SAF. El SNC, el corazón, los ojos, las

extremidades, los dientes, las orejas, el paladar y los genitales externos son vulnerables al etanol durante el primer trimestre. Por lo tanto, malformaciones en estas áreas indican que el daño causado por el etanol se originó en estadios tempranos del desarrollo.

El diagnóstico del SAF es factible entre los 4 y 14 años de edad. La mayoría de los signos dismórficos del SAF pueden acabar desapareciendo o diluyéndose al final de la adolescencia y la vida adulta, complicando su detección (Streissguth y col., 1991). Un factor fundamental para determinar el grado de los efectos del SAF es la concentración de etanol en sangre durante el tercer trimestre, crítico para el desarrollo del cerebro como se ha comentado.

Se considera que por cada individuo diagnosticado de SAF existen 10 no diagnosticados que sufren efectos adversos por consumo materno de etanol.

1.3. Potenciales farmacoterapias frente a los DRAF

No existe un tratamiento específico, tan sólo de tipo sintomático con cirugía correctora de los defectos anatómicos y el soporte psicopedagógico para paliar las discapacidades cognitivo-conductuales. La prevención se presenta por tanto como una intervención clave para evitar este problema. Sin embargo, la prevalencia de los DRAF indica que no existe una concienciación suficiente por parte de la sociedad. Debido a ello, existen diversos estudios basados en el desarrollo de posibles farmacoterapias prenatales capaces de mitigar los efectos teratogénos del etanol. A continuación mostramos algunos ejemplos:

Antioxidantes

El estrés oxidativo inducido por la exposición a etanol contribuye al daño y muerte celular en individuos con DRAF (Henderson y col., 1995). La exposición a etanol no solamente induce estrés oxidativo en el cerebro en desarrollo, sino que además disminuye la capacidad de los antioxidantes endógenos (Cohen-Kerem y Koren, 2003). Asimismo, los embriones animales poseen una capacidad antioxidante intrínseca menor (Addolorato y col., 1997). Para contrarrestar el estrés oxidativo, algunos ejemplos de terapias son el uso de: 1) la Vitamina C, recientemente descrita como protectora frente a los DRAF (Peng y col., 2005), 2) la Vitamina E, capaz de prevenir la pérdida celular inducida por el etanol (Siler-Marsiglio y col., 2004), 3) la superóxido dismutasa (SOD), la cual reduce la toxicidad del etanol en cultivos celulares y embriones (Chen y Sulik, 1996, 2000), y 4) los flavonoides (La Grange y col., 1999).

Vitamina A

La vitamina A es un precursor del ácido retinoico (RA), el cual es un potente mediador en la embriogénesis y la diferenciación, y juega un papel crucial en el desarrollo (Maden, 2007). El etanol interfiere en la señalización dependiente de RA (Deltour y col., 1996) y altera su metabolismo (DeJonge y Zachman, 1995). Sin embargo, el suplemento de vitamina A altas dosis en individuos alcohólicos puede provocar hepatotoxicidad (Leo y Lieber, 1999). Una solución a ello es el β -caroteno, un precursor inocuo del retinol, que actúa como antioxidante de forma más eficientemente (Burton y Ingold, 1984).

Octanol-1

El etanol interfiere en el desarrollo cerebral alterando las uniones intercelulares. Estas moléculas de adhesión celular implicadas en las uniones célula-célula participan en procesos importantes para el desarrollo del SNC (Panicker y col., 2003). Los alcoholes de cadena corta, como el etanol, alteran dicha adhesión mediada por la proteína L1-CAM (Wilkemeyer y col., 2000), mientras que aquellos alcoholes que contienen cinco o más carbonos muestran efectos contrarios. Concretamente, 1-octanol antagoniza el efecto del etanol en la adhesión celular (Wilkemeyer y col., 2002) y previene los efectos teratógenos del etanol en embriones de ratón (Chen y col., 2001).

Péptidos

NAPVSIPQ (NAP) y SALLRSIPA (SAL) son pequeños péptidos de la proteína neuroprotectora dependiente de actividad (ADNP) y del factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF), respectivamente. Estos dos péptidos protegen frente al etanol (Spong y col., 2001), antagonizando la inhibición de L1-CAM (Wilkemeyer y col., 2003).

Factores neurotróficos y de crecimiento

El etanol interfiere en la señalización de varios factores de crecimiento implicados en el desarrollo cerebral, como por ejemplo las rutas de señalización de la insulina (Hallak y col., 2001). Al tratar con el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) se reduce la neurotoxicidad del etanol (Barclay y col., 2005). Su sobreexpresión disminuye la sensibilidad y tolerancia al etanol en ratones transgénicos (Pucilowski y col., 1996). Otros factores con capacidad neuroprotectora son el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor de crecimiento básico de fibroblasto (bFGF) y los estrógenos (Rahman y col., 1994; Luo y col., 1997; Barclay y col., 2005). El factor de crecimiento similar a EGF unido a heparina (HB-EGF) previene la apoptosis en embriones expuestos a una elevada concentración de etanol (Kilburn

y col., 2006). Actualmente, el factor-12 neurotrófico dependiente de actividad (ADNF-12) también previene la muerte fetal y anomalías en el aprendizaje y el desarrollo que aparecen en ratones alcoholizados (Endres y col., 2005).

Agonistas del receptor de serotonina

Las neuronas que contienen serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) en el desarrollo son muy sensibles al daño producido por el etanol (Druse y col., 1991). Agonistas del receptor 5-HT_{1A} revierten la disminución del número de neuronas 5-HT inducida por el etanol (Eriksen y Druse, 2001). En astrocitos, la estimulación de los receptores 5-HT_{1A} provoca la liberación de S100 β (Eriksen y col., 2002), la cual contribuye a los efectos anti-apoptóticos de los agonistas de 5-HT_{1A} y estimula el desarrollo y diferenciación de este tipo neuronal, así como el crecimiento de sus neuritas (Selinfreund y col., 1991).

Nicotinamida

El etanol desencadena procesos apoptóticos y neurodegeneración celular inhibiendo la función de algunos receptores de glutamato, actuando como un agonista del NMDA (Dodd y col., 2000; Ikonomidou y col., 2000). Por otro lado, el etanol estimula los receptores GABA_A, mimetizando la acción de GABA y desencadenando una respuesta final similar a la anterior (Harris y col., 1995; Ikonomidou y col., 2000). La nicotinamida previene completamente esta muerte neuronal inducida por etanol. Este precursor de la coenzima NAD⁺ previene el estrés oxidativo y la disminución de NAD⁺ manteniendo la funcionalidad mitocondrial para el aporte energético (Chong y col., 2002; Ieraci y Herrera, 2006).

1.4. Teratogénesis del etanol en modelos experimentales

Se ha conseguido reproducir las características más evidentes de los DRAF (anomalías faciales, deficiencias en el crecimiento y disfunciones en el SNC) en uno o más modelos animales expuestos al etanol durante el desarrollo (e.j.: pollos, ratones, ratas o primates). Estos modelos animales permiten estudiar los efectos de la exposición fetal a etanol en el contexto de un organismo intacto, sobre el cual se pueden controlar diversos factores que influyen en la estructura, función y conducta del desarrollo del SNC. Estos factores son el patrón y duración de la exposición, la concentración de alcohol en sangre, el período gestacional y los tipos celulares o regiones cerebrales afectadas. Además, se pueden regular las condiciones 'no controlables' como la nutrición, la base genética o el (ab)uso de otras sustancias, que pueden afectar también al desarrollo cerebral.

No obstante, los modelos animales de exposición fetal a etanol presentan inconvenientes. Existen diferencias en el proceso gestacional. Por ejemplo, en ratas los primeros 10 días postnatales equivalen al tercer trimestre en humanos (Dobbing y Sands, 1979). Por otro lado, también existen diferencias entre animales y humanos en el metabolismo del etanol y en la complejidad del SNC. Asimismo, antes de iniciar un estudio con animales debe considerarse el momento en que se desarrolla la estructura cerebral de interés, los momentos del desarrollo en los cuales administrar el etanol y evaluar las alteraciones. Otro inconveniente es que ningún modelo animal de DRAF muestra todas las alteraciones diagnosticables en humanos. Por todo ello, es importante considerar previamente el campo a estudiar antes de escoger un modelo animal (Cudd, 2005). Obviamente, la concentración de etanol a la que se exponga el cerebro fetal del animal debe ser similar a las concentraciones encontradas en madres gestantes.

Existen principalmente tres técnicas para administrar etanol en modelos animales (Ponnappa y Rubin, 2000): 1) el modelo de la dieta líquida, en el cual el etanol se administra disuelto en agua, 2) el modelo intragástrico, donde a través de la dieta líquida el etanol se infunde directamente en el estómago utilizando un catéter implantado, y 3) el modelo por inhalación, donde se administra el etanol en forma de vapor.

Roedores

Las ratas y los ratones son uno de los modelos más utilizados para estudiar DRAF. Existe una amplia bibliografía sobre datos anatómicos, farmacológicos, fisiológicos y conductuales. Poseen una gestación corta y son económicos tanto de adquirir como de mantener. Destacar que el crecimiento cerebral masivo es postnatal y que, afortunadamente, las pruebas conductuales en roedores son extrapolables a los humanos (Stanton y Goodlett, 1998). Los ratones muestran un gran potencial para ser manipulados genéticamente (Crabbe y col., 1999) y se han utilizado con éxito para estudiar la dismorfología facial (Sulik y col., 1981). El conejillo de Indias también se ha utilizado como modelo animal (Kimura y col., 1999). Éste presenta un periodo gestacional más largo y su mayor crecimiento cerebral es prenatal, lo que permite evaluar las influencias materna y de la placenta en los efectos del etanol durante estos períodos.

Otros modelos mamíferos

Los estudios realizados en primates (Clarren y Borden, 1982) presentan varios inconvenientes, como un crecimiento cerebral masivo prenatal en estadíos anteriores al de los humanos, un coste económico muy elevado, riesgo a padecer mordeduras y posible zoonosis, así como consideraciones de tipo ético. Sin embargo, el cerdo resulta ventajoso porque al igual que los

humanos es la única especie que presenta preferencia por el etanol y tiene además una dinámica de crecimiento cerebral similar a la de los humanos. Finalmente, otro mamífero utilizado es la oveja. Con ella se han realizado una gran cantidad de estudios básicos de la fisiología fetal, gracias a la fortaleza de sus fetos (Patrick y col., 1985). Como desventajas destacar que las ovejas presentan un crecimiento cerebral masivo prenatal anterior al de los humanos y que su gestación es larga.

Otros modelos no mamíferos

Otros animales no mamíferos utilizados son los pollos (Smith, 1997) los cuales tienen una gestación corta y carecen de placenta; el pez cebra (*Brachydanio rerio*) (Pan y col., 2010), los nematodos (*Caenorhabditis elegans*) (Mitchell y col., 2010) y la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*) (Rothenfluh y col., 2002). Todos ellos con la ventaja de tener un sistema nervioso simple y con tiempos cortos de gestación y desarrollo.

Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro*, células o tejidos, nos permiten un estudio más minucioso y exhaustivo de los efectos del etanol. Existen diversos estudios realizados en cultivos primarios (Saunders y col., 1997; Pantazis y col., 1998) o líneas celulares (Saunders y col., 1995), que nos indican la capacidad del etanol de inducir apoptosis (Bhave y Hoffman, 1997), generar estrés oxidativo (Chen y Sulik, 1996), alterar la adhesión celular (Ramanathan y col., 1996), perturbar la producción o respuesta a factores neurotróficos (Cui y col., 1997) y moléculas reguladoras del desarrollo (Deltour y col., 1996).

De las múltiples células neurales, las células gliales son una diana importante de la teratogénesis del etanol debido a su implicación en múltiples procesos del desarrollo. Evidencias experimentales demuestran que la exposición fetal a etanol: 1) disminuye la población de glia radial y su consecuente aporte de neuronas y astrocitos (Rubert y col., 2006), 2) altera la proliferación y supervivencia glial, lo que repercute en el aporte trófico a las neuronas y en la regulación de la sinaptogénesis (Pascual y Guerri, 2007), 3) produce pérdidas importantes de materia blanca (principalmente astrocitos, oligodendrocitos y mielina); y 4) afecta al metabolismo cerebral a causa de alteraciones gliales (Fagerlund y col., 2006). Resumiendo, la alteración de la glia en el desarrollo cerebral provocada por el etanol afecta la actividad neuronal, induciendo alteraciones metabólicas y estructurales permanentes, indicándonos que existe una conexión entre los efectos teratogénicos del etanol, las células gliales y las consecuencias permanentes en el SNC.

Innegablemente, la principal desventaja de este tipo de modelos es la extrapolación de los mecanismos de acción observados *in vitro* a conjuntos de señalización que se producen simultáneamente e interaccionan en un cerebro en desarrollo. Sin embargo, el poder manipular las células o tejidos y su ambiente nos permite elucidar los mecanismos (anteriormente comentados en el punto 1.1.3) por los cuales el etanol afecta al desarrollo, información que no podemos obtener, o con mucha mayor dificultad, en modelos animales. Gracias a los estudios realizados *in vitro* se han conseguido entender el origen y la casuística de múltiples alteraciones observadas en DRAF, así como los mecanismos moleculares por los cuales el etanol ejerce sus efectos teratogénos

2. Los astrocitos y desarrollo del Sistema Nervioso Central

En el cerebro existen principalmente dos tipos células neurales: las neuronas y la glia. La diferencia fundamental entre ellas es la excitabilidad. Las neuronas son eléctricamente excitables y capaces de responder a estímulos externos mediante la generación de un potencial de membrana que se propaga a través de una red neuronal mediante sinapsis químicas. Por el contrario, la glia no posee esa propiedad y además tiene capacidad mitótica, lo que no se da en las neuronas (Kandel y col., 2000).

Las células gliales constituyen el 90% de las células neurales (Figura 5). En el sistema nervioso central (SNC) están representadas por tres tipos: astrocitos, oligodendrocitos y células ependimiales, conocidas en conjunto como células macrogliales o células neurogliales. Los oligodendrocitos producen mielina, la cual aísla los axones y permite una rápida propagación de los potenciales de acción (Bradi y Lassmann, 2010). Las células ependimiales forman las paredes de los ventrículos del cerebro y el canal central de la espina dorsal. Además participan en la producción y circulación del líquido cefalorraquídeo (CSF) (de Reuck y Vanderdonckt, 1986). Más allá de la macroglía, la glia comprende la microglía, células gliales de origen no neuronal (del mesodermo) y que derivan de macrófagos que invaden el cerebro durante etapas iniciales del desarrollo (Graeber y Streit, 2010). Por otro lado, en el sistema nervioso periférico (SNP) el principal tipo de célula glial son las células de Schwann, que envuelven y mielinizan los axones periféricos (Mirsky y Jessen, 1996).

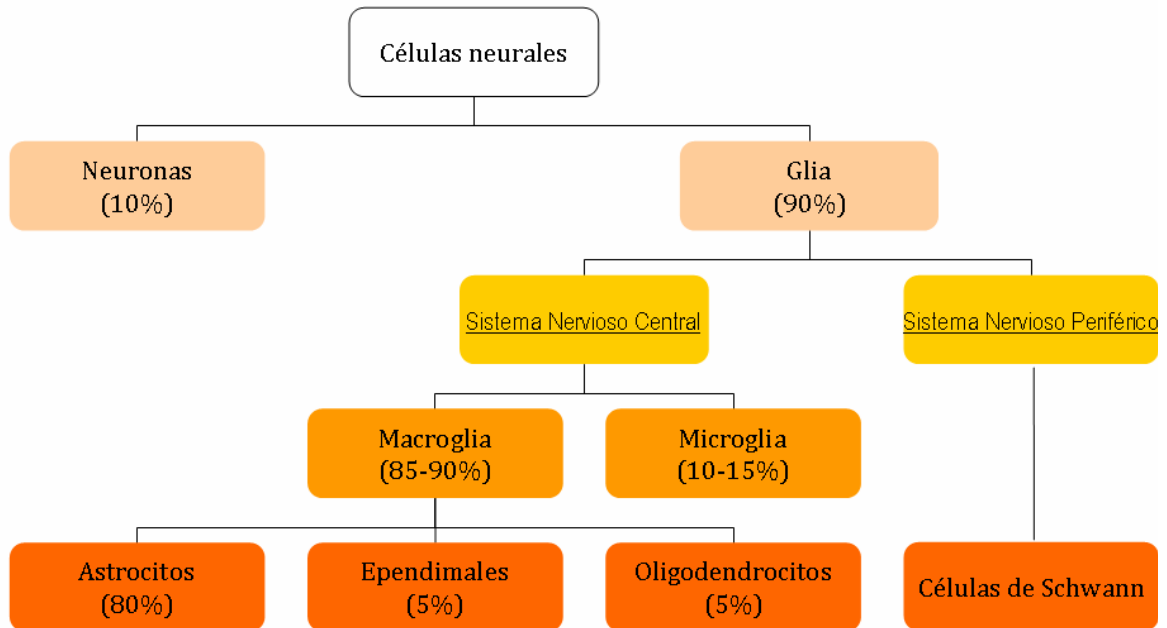


Figura 5. Tipos de células neurales. Las células neurales se pueden clasificar en neuronas y células gliales, estas últimas mucho más numerosas. Existen diferentes tipos de células gliales pertenecientes tanto al SNC como al SNP. Los astrocitos son el tipo celular glial más abundante del SNC. Figura modificada de Verkhatsky y Butt, 2007.

Los astrocitos son las células más numerosas y diversas del SNC. Su morfología es muy variada pero la mayoría tienen una morfología estrellada. Una característica típica de los astrocitos es la expresión de los filamentos intermedios, compuestos mayoritariamente por la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) y la vimentina. Por eso, la expresión de GFAP se utiliza como marcador específico para la identificación de astrocitos (Eng y col., 2000), aunque parece ser que no todos los astrocitos expresan GFAP (Kimelberg, 2004).

El término astroglia engloba a un conjunto de diversas células gliales. El más abundante son los astrocitos, que comprende los astrocitos protoplasmáticos y fibrosos localizados respectivamente en las sustancias gris y blanca. El segundo gran grupo de células astrogliales son la glia radial, células bipolares con un cuerpo ovoide y proyecciones alargadas. Normalmente tienen dos proyecciones, una hacia la pared ventricular y la otra hacia la superficie de la piamadre. La presencia de la glia radial es un signo del cerebro en desarrollo ya que son las primeras células que se derivan de los precursores neurales (Campbell y Götz, 2002). Desde etapas iniciales de la embriogénesis, la glia radial forma una plataforma que asiste a la migración neuronal. En la madurez del SNC esta glia radial desaparece para convertirse en astrocitos, permaneciendo como tal solamente en la retina y cerebelo (Soriano y col., 1997; Quesada y col., 2004).

2.1. Ontogenia de las células astrogiales

Durante mucho tiempo se había especulado que los neuroblastos y glioblastos aparecían muy al principio del desarrollo y que eran dos poblaciones celulares distintas productoras de neuronas o células gliales, respectivamente (Figura 6). Asimismo, se hipotetizaba que estas células precursoras solamente aparecían en el desarrollo y se ausentaban en el cerebro adulto, ver Figura 6. Actualmente, se sabe que todas las células neurales derivan del neuroepitelio que forma el tubo neural. Estas células son pluripotenciales y se definen como precursores

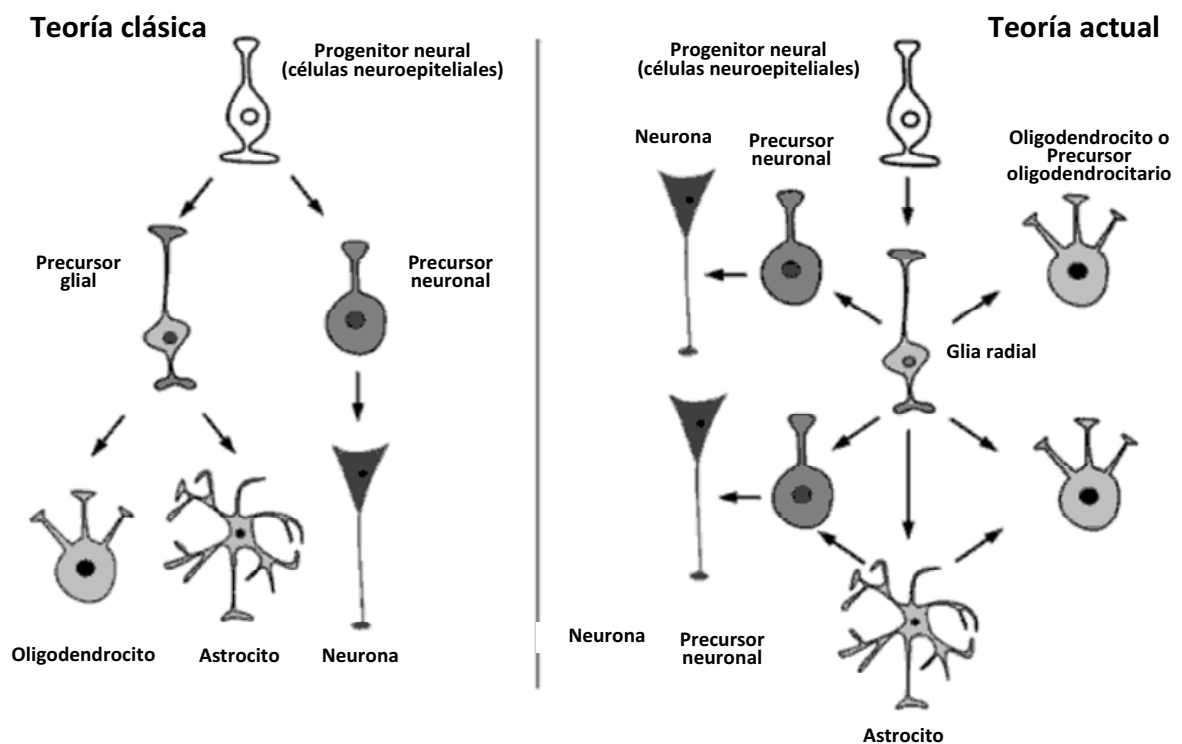


Figura 6. Ontogenia de las células neurales. Tradicionalmente se creía que, solamente en etapas del desarrollo, existían precursores neuronales y gliales capaces de diferenciarse dando lugar a neuronas y células gliales, respectivamente. Actualmente se sabe que un único precursor neural es capaz de dar tanto neuronas como células gliales, que está presente en el cerebro adulto y que posee características de la glia. Figura modificada de Verkhatsky y Butt, 2007.

neurales ya que su progenie puede diferenciarse a precursoras gliales o neuronales (glioblastos o neuroblastos) que posteriormente pueden acabar dando neuronas o células macrogliales (Kriegstein y Álvarez-Buylla, 2009) (Figura 6). Además, el cerebro adulto contiene numerosos precursores neuronales con características gliales, las cuales pueden proporcionar nuevas neuronas (Doetsch, 2003).

El desarrollo de astrocitos y oligodendrocitos a partir de precursores gliales pasa por diferentes etapas. Primero se forma un precursor glia bipotencial, llamado O-2A (oligodendrocito tipo 2 astrocito) que puede llegar a diferenciarse a cualquier tipo de célula glial (Raff y col., 1983). Los precursores gliales son pequeños, con pocas prolongaciones y móviles, pudiendo migrar por toda la sustancia blanca y gris cerebral. A medida que migran, estos precursores se diferencian y adquieren marcadores astrocitarios u oligodendrocitarios. En el lóbulo frontal, los precursores neurales de la zona subventricular migran hacia la sustancia blanca de la corteza, y se convierten en astrocitos, oligodendrocitos y glia NG2 (Levison y Goldman, 1993; Luskin, 1993; Luskin y McDermott, 1994). En el cerebelo, la glia de Bergmann y algunos astrocitos derivan de la glia radial, y más adelante en el desarrollo migrarán desde un área dorsal hacia el cuarto ventrículo dando lugar a astrocitos y oligodendrocitos (Zhang y Goldman, 1996; Milosevic y Goldman, 2002). En la retina embrionaria, un mismo precursor dará lugar a neuronas y células de Müller, mientras que precursores gliales que migran hacia el nervio óptico se diferencian a astrocitos (Skoff y Knapp, 1991). Por último, en la espina dorsal astrocitos y oligodendrocitos derivan de diferentes precursores de la zona ventricular (Pringle y col., 2003).

En los mamíferos la neurogénesis puede darse en adultos, en ciertas condiciones, provocando la aparición de nuevas neuronas que se añaden a los circuitos neurales. No obstante, esta presentación de nuevas neuronas está restringida a zonas como el hipocampo (zona subgranular) y el bulbo olfativo (zona subventricular). En estas regiones las células madre tienen propiedades astrocitarias (Goldman, 2003; Horner y Palmer, 2003).

2.2. Tipos de astroglia

Además de los conocidos astrocitos protoplasmáticos y fibrosos de las sustancias gris y blanca, respectivamente, existen diversos tipos de células astrogliales especializadas, localizadas en regiones específicas del SNC (Figura 7). A continuación explicamos brevemente algunos de los distintos tipos de astroglia.

Astrocitos protoplasmáticos

Presentes en la sustancia gris y están dotados de proyecciones pequeñas ($\approx 50\mu\text{m}$), elaboradas y complejas. Estas prolongaciones rodean a vasos sanguíneos, forman múltiples contactos con las neuronas o la piamadre. La densidad de estos astrocitos en la corteza es de 10.000-30.000/mm³ y ocupan un área de hasta 80.000 μm^2 (Distler y col., 1991; Bushong y col., 2002; Chao y col., 2002).

Astroцитos fibrosos

Localizados en la sustancia blanca. Sus proyecciones son largas ($\approx 300 \mu\text{m}$) pero menos elaboradas que las de los astroцитos protoplasmáticos y contactan con los vasos sanguíneos, la piamadre y los axones a nivel de los nódulos de Ranvier. La densidad de estos astroцитos es de aproximadamente $200.000/\text{mm}^3$ (Butt y col., 1994a, 1994b).

Células de Müller

Es una glia radial especializada de la retina, que contacta con neuronas de la retina y extiende sus prolongaciones a lo largo de la línea de conos y bastones. En regiones concretas de la retina adquieren un fenotipo similar al de los astroцитos protoplasmáticos. En humanos, ocupan un 20% del volumen de la retina (su densidad es de $25.000/\text{mm}^2$) y una sola célula de Müller sostiene a 16 neuronas (Sarthy y Ripps, 2001).

Glia de Bergmann

Son los astroцитos radiales del cerebelo de los vertebrados. Tienen un soma pequeño ($15 \mu\text{m}$ de diámetro) y entre 3-6 proyecciones que se extienden desde la capa de células de Purkinje hasta la piamadre. En los roedores, 8 células de la glia de Bergmann rodean una neurona de Purkinje, y sus proyecciones envuelven las dendritas neuronales. Las proyecciones de la glia de Bergmann suministran cobertura en las sinapsis (una sola célula cobija entre 2.000-6.000 sinapsis) (Reichenbach y col., 1995; Grosche y col., 1999, 2002).

Astroцитos interlaminares

Son específicos de la corteza cerebral de los grandes primates y poseen largas proyecciones ($\approx 1\text{mm}$) que se extiende desde el soma (localizado en la capa subgranular) hasta la IV capa cortical. Se desconoce su función aunque podrían estar involucradas en delimitar los módulos corticales que se extienden a través de las capas corticales (Colombo y col., 1995, 2001).

Tanicitos

Son astroцитos especializados hallados en órganos periventriculares, la hipófisis y la espina dorsal. En los órganos periventriculares, los tanicitos forman una barrera con capilares sanguíneos que contiene uniones defenestradas. Esto permite cierta permeabilidad entre el parénquima neural y el fluido cerebroespinal (Wolburg y Paulus, 2010).

Pituicitos

Son astrocitos de la neurohipófisis. Sus proyecciones envuelven los axones secretores y terminaciones axonales en reposo (Rosso y Mienville, 2009).

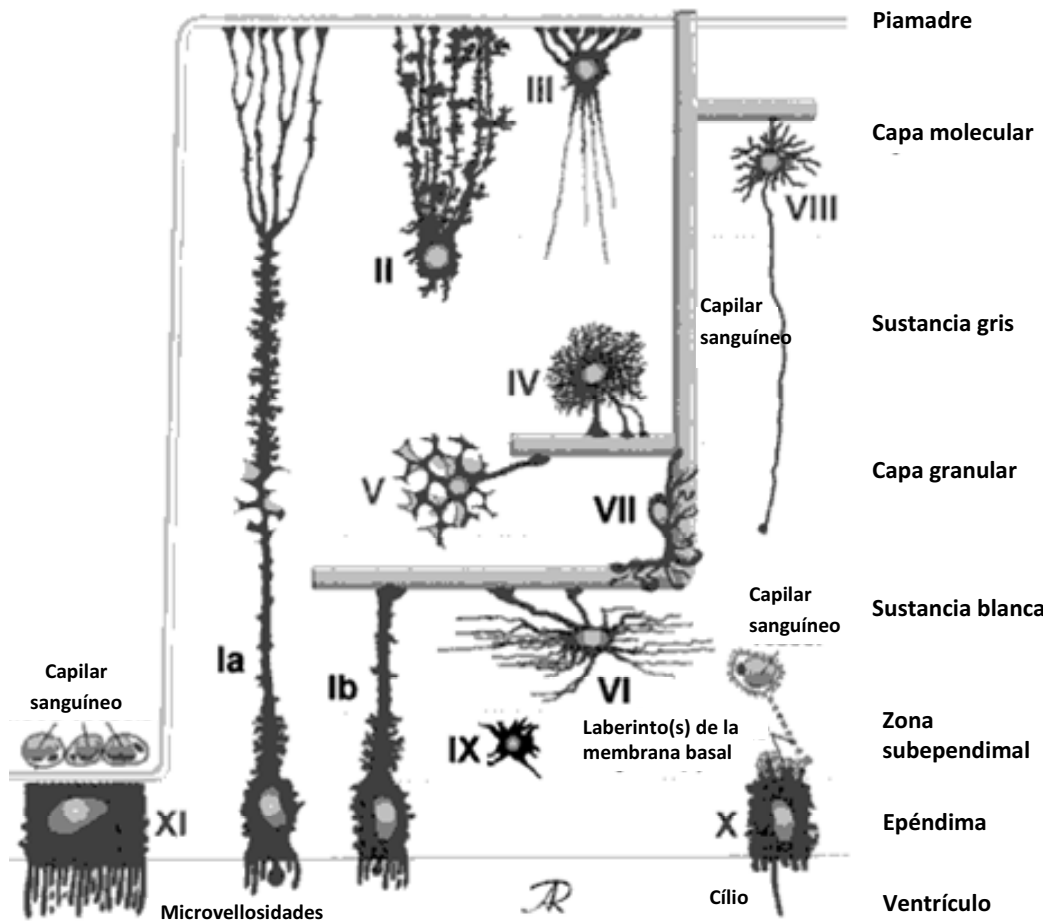


Figura 7. Diferentes tipos de células astrogliales en el SNC. I: tanicito, II: glia de Bergmann, III: astrocito marginal; IV: astrocito protoplasmático, V: astrocito *velate*, VI: astrocito fibroso, VII: astrocito perivascular, VIII: astrocito interlaminar, IX: astrocito inmaduro, X: epéndimocito, XI: célula del plexo coroideo. Figura modificada de Kettenmann y Ransom, 2005.

2.3 Funciones de la astroglia

Las células astrogliales sirven para una gran y diversa variedad de funciones, vitales para el correcto funcionamiento del cerebro durante el desarrollo. En este periodo la astroglia participa en el control de la arquitectura cerebral, la vascularización, el metabolismo y el microambiente del SNC.

1. - *DESARROLLO*

La neurogénesis en el cerebro adulto humano está localizada únicamente en el hipocampo y en la zona subventricular, y en ambas regiones las células madre que dan lugar a neuronas se consideran astrogiales porque: 1) expresan GFAP, 2) conectan con los vasos sanguíneos, 3) no son excitables, y 4) expresan predominantemente canales de K^+ . Los precursores que residen en estas dos regiones son multipotenciales, pudiendo originar neuronas y glia. Por el contrario, la gliogénesis tiene lugar en todas las regiones cerebrales, y la zona de generación define el tipo de glia que se producirá (Goldman, 2003; Horner y Palmer, 2003).

Las primeras células neurales a desarrollarse son la glia radial, después los precursores de la zona ventricular y subventricular migran hasta sus destinos dando lugar a todo tipo de células neurales. Una de las principales funciones de la glia radial es la proveer de una estructura para orientar la migración de los precursores neurales. Posteriormente, la glia radial fetal desaparece y se transforma en astrocitos (Mori y col., 2005). Además, en etapas embrionarias los astrocitos forman canales que orientan y fomentan el crecimiento axonal. El caso opuesto sucede en el cerebro adulto donde los astrocitos maduros inhiben el crecimiento axonal (e.j.: la cicatriz glial) (Shu y Richards, 2001).

Recientemente se ha descubierto que además de neuronas, las células gliales regulan las sinapsis neuronales. En mamíferos, en los primeros días postnatales se forma un elevado número de sinapsis que vienen acompañadas de una generación de astrocitos, los cuales colaboran en la aparición de estas sinapsis. Esto se debe a que los astrocitos: 1) producen y secretan colesterol formando nuevas membranas, 2) secretan hormonas esteroideas que actúan como señales sinápticas y 3) expresan agrina, proteína implicada en la generación de sinapsis (Mauch y col., 2001). Además, los astrocitos controlan la maduración de las sinapsis aumentando la densidad de receptores postsinápticos, gracias a la liberación de factores como el factor de necrosis tumoral ($TNF\alpha$) y el ADNF (Schwartz, 1992; Bilbo y Schwartz, 2009). Finalmente, las prolongaciones astrocitarias participan en la eliminación de la sinapsis entrando en la hendidura sináptica, cierran el contacto y sustituyen la sinapsis por otra.

2. - *ESTRUCTURAL*

Los astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris controlan y se reparten su territorio sin solaparse entre ellos, contactando con los vasos sanguíneos y las sinapsis neuronales (Figura 8, entre 1×10^6 - 2×10^6 sinapsis/astrocito). Las prolongaciones astrocitarias proporcionan el sostén o soporte necesario gracias a que captan la actividad transcurrida en su dominio (Lin y Bergles, 2004).

3. – VASCULAR

El tejido neuronal está separado del torrente sanguíneo por tres sistemas: 1) la barrera del plexo coroideo-CSF; 2) la barrera que separa el líquido cefalorraquídeo presente en el espacio subaracnoideo y 3) la barrera hematoencefálica entre los capilares intracerebrales y el parénquima cerebral, formando uniones estrechas entre las células endoteliales (Figura 8). La barrera se extiende por todo el cerebro a excepción de los órganos circumventriculares, la neurohipófisis, la glándula pineal, órganos subfornicales y la *lámina terminalis*. Las células endoteliales del SNC se diferencian del resto en que las primeras forman numerosas uniones estrechas, que previenen el transporte paracelular de macromoléculas. Anatómicamente, la barrera está formada por prolongaciones astrocitarias que rodean las células endoteliales (Figura 8). Los astrocitos secretan factores solubles como el TGF β y el GDNF, que favorecen la formación de uniones estrechas y estimulan la polarización de la membrana luminal y basal de las células endoteliales, debido a la expresión de canales iónicos y proteínas involucradas en el transporte. Las células endoteliales también señalizan a los astrocitos para secretar factor inhibidor de leucemia (LIF) el cual promueve la maduración astrocitaria. Esta maduración conlleva la expresión de receptores (aquaporina 4) o canales iónicos (canales de K⁺) en la membrana de los astrocitos (Rubin y Staddon, 1999; Abbott y col., 2006; Iadecola y Nedergaard, 2007).

La principal función de la barrera hematoencefálica es la de formar un sustrato para el sostén homeostático del cerebro. Las células endoteliales poseen una permeabilidad selectiva gracias a los transportadores específicos de sus membranas: 1) transportadores de unión a adenina, que excretan compuestos xenobióticos; 2) transportadores de aminoácidos; 3) transportadores de glucosa, GLUT1; e 4) intercambiadores iónicos. Las membranas de las prolongaciones astrocitarias están enriquecidas con numerosos receptores, transportadores y canales que median en la comunicación entre las células gliales y endoteliales y regulan la interfaz glia-vascular. Cada prolongación astrocitaria contacta con un capilar, estableciendo así unidades neurovasculares independientes (Rubin y Staddon, 1999; Abbott y col., 2006; Iadecola y Nedergaard, 2007).

Por otro lado, también se ha observado que señales de Ca²⁺ originadas por la actividad neuronal entran en las prolongaciones astrocitarias provocando una liberación de factores vasodilatadores o vasoconstrictores en los capilares, lo que conlleva a una regulación de la microcirculación cerebral (Iadecola y Nedergaard, 2007).

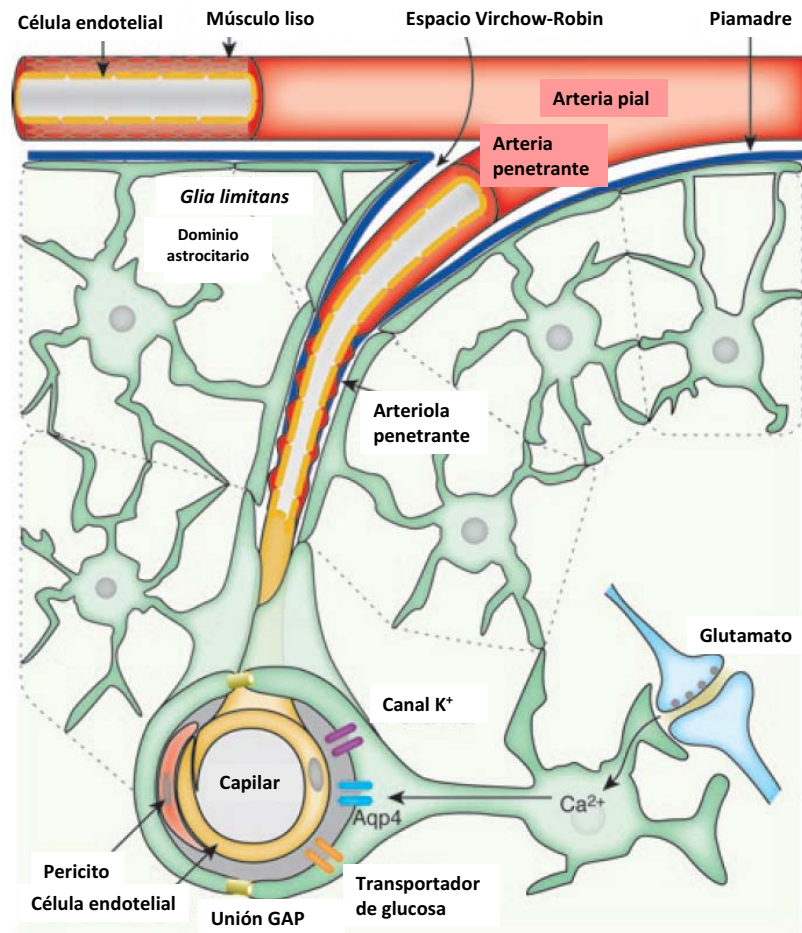


Figura 8. Estructura de la unidad neurovascular. En el SNC las células endoteliales de los capilares sanguíneos están envueltas por los pies astrocitarios que fomentan la formación de uniones estrechas entre las células endoteliales. Figura de Iadecola y Nedergaard, 2007.

4. - MICROAMBIENTAL

El control de la homeostasis iónica extracelular en el cerebro es vital para mantener el potencial de reposo y la excitabilidad neuronales. El espacio extracelular contiene concentraciones elevadas de Na^+ y de Cl^- y concentraciones bajas de K^+ , porque las células neurales contienen en el citoplasma altas concentraciones de K^+ y bajas de Na^+ . Este gradiente iónico se consigue gracias a múltiples sistemas de transporte iónico, bien por difusión (canales iónicos) o a expensas de energía (bombas e intercambiadores iónicos). Por su parte, los astrocitos regulan esta concentración extracelular de K^+ mediante canales de K^+ y transportadores o bien con su 'tamponamiento espacial'. Este último consiste en que el K^+ que entra en la célula se distribuye por toda la red astrocitaria por corrientes intracelulares a través de uniones GAP. Posteriormente, el K^+ se excreta en la zona intersticial que acabará saliendo al torrente sanguíneo (Kofuji y Newman, 2004).

En cuanto al Cl^- , las concentraciones intracelulares son bajas en neuronas pero elevadas en astrocitos, ya que para regular el intercambio de Na^+ y K^+ utilizan transportadores de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Walz, 2002).

La concentración de Ca^{2+} es baja en el medio extracelular y todavía más en el citosol. Por ello, una bajada de la concentración extracelular de Ca^{2+} provoca una liberación intracelular en el retículo endoplasmático de los astrocitos, que llega al espacio extracelular mediante intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Deitmer y Verkhratsky, 1998).

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC y su concentración extracelular debe ser siempre muy baja ya que es muy neurotóxico (Pasti y col., 1995). Los astrocitos regulan su concentración extracelular, delimitando morfológicamente las sinapsis glutamatérgicas y sellando la hendidura sináptica. Además, el glutamato liberado es recogido rápidamente por los transportadores de glutamato presentes en las membranas astrocitarias (Hertz y col., 1999). Finalmente, los astrocitos metabolizan el glutamato captado a glutamina (no neurotóxica) y lo liberan para que sea recaptado por el terminal neuronal presináptico (Magistretti y Pellerin, 1999).

El intercambio de agua entre la sangre y el parénquima cerebral está regulado por las aquaporinas (canales de agua) concentradas en los terminales astrocitarios. Los astrocitos también regulan la entrada de agua mediante receptores de vasopresina (V_1), y por el sistema renina-angiotensina (Simard y Nedergaard, 2004).

5. – METABÓLICO

El cerebro produce energía oxidando la glucosa y el oxígeno que recibe del torrente sanguíneo. La glucosa es captada por los transportadores de glucosa GLUT1 existentes en las células endoteliales y luego se secreta al espacio intersticial. Posteriormente, se acumula en las células neurales a través de los transportadores de glucosa (GLUT3 en neuronas y GLUT1 en astrocitos). Con el fin de mantener los gradientes iónicos transmembranales las neuronas consumen el 90 % de la energía, mientras que las células gliales el 10% restante. Sin embargo, la acumulación de glucosa es igual en ambas. Esto implica la utilización de un intermediario de la glucosa, el lactato, que es sintetizado en las células gliales y transportado hasta las neuronas. Esta vía se conoce como la glicólisis aeróbica (Figura 9), donde la glucosa pasa primero a piruvato y posteriormente a lactato en la presencia de oxígeno. Esto último se realiza a través de la enzima lactato deshidrogenada tipo 5 (LDH5). Este proceso está estrechamente ligado con la acumulación y procesamiento del glutamato durante la sinapsis. El glutamato entra en los astrocitos y provoca un incremento de Na^+ intracelular, que es secretado mediante bombas de Na^+/K^+ , activadoras de la fosfoglicerato quinasa (PGK) que

estimula la producción de lactato. Posteriormente, el lactato es llevado hasta las neuronas por dos transportadores de monocarboxilasa (MCT-1, en astrocitos; MCT-2, en neuronas). Una vez llega a las neuronas, el lactato es convertido en piruvato por la LDH1 y utilizado para producir energía. Este sistema está regulado por la demanda energética neuronal, ya que los transportadores de glucosa presentes en los astrocitos (GLUT1) incrementan su captación por estimulación del glutamato secretado durante la sinapsis (Pellerin y col., 2007).

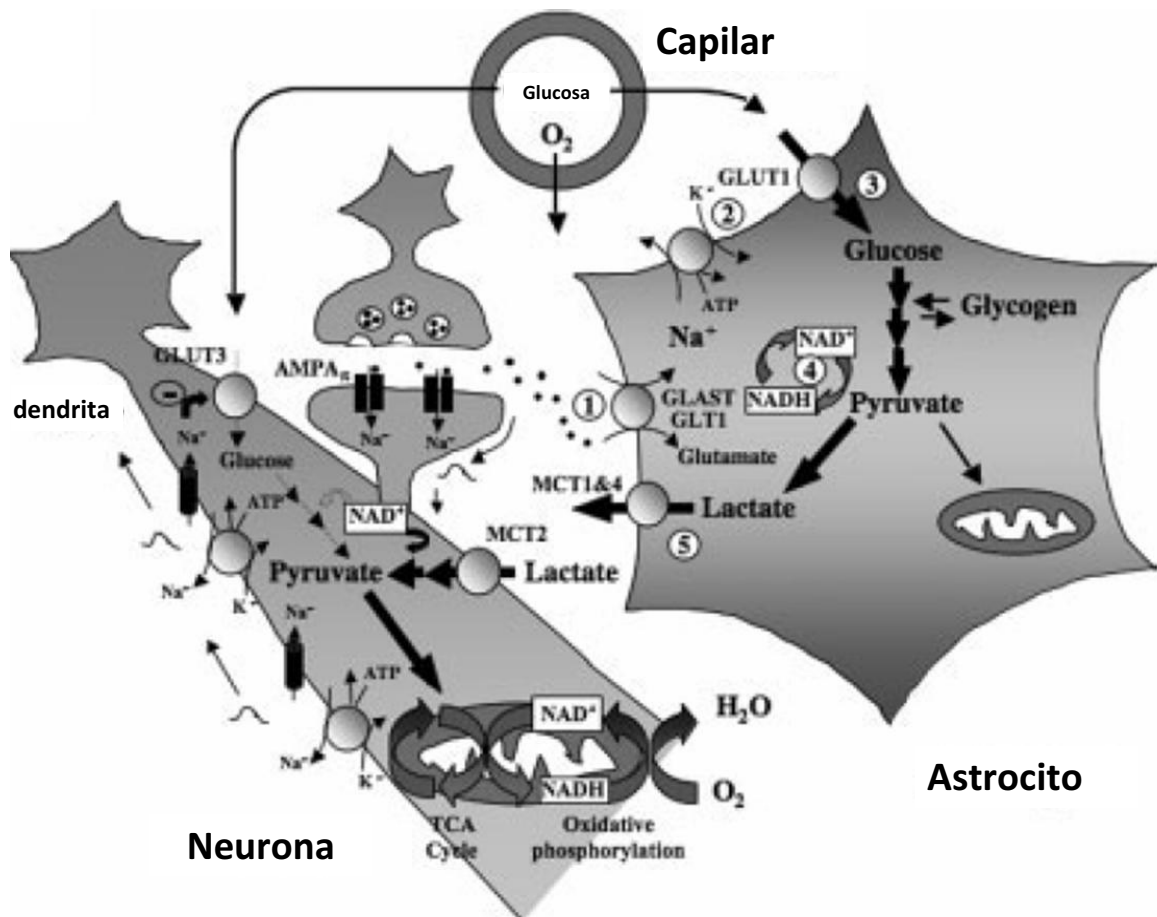


Figura 9. Esquema del acoplamiento metabólico entre neuronas y astrocitos. Los astrocitos juegan un papel fundamental en el aporte energético neuronal. Mediante el proceso de glicólisis aeróbica los astrocitos producen lactato que es consumido por las neuronas. Este proceso se puede regular mediante la señalización glutamatérgica neuronal. GLUT1 y GLUT3: transportadores de glucosa, MCT1, MCT2 y MCT4: transportadores de ácidos monocarboxílicos, GLAST: transportadores de glutamato, GLT1: transportador glial 1, AMPA_R: receptor de ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico, NAD⁺: Glicerol-3-fosfato deshidrogenada, NADH: nicotinamida adenina dinucleótido, ATP: adenosina trifosfato. Figura modificada de Pellerin y col., 2007.

Cuando existe una estimulación intensa del SNC, se moviliza glucógeno y se transforma en glucosa para hacer frente a toda esa demanda. El glucógeno en el SNC está almacenado casi exclusivamente en los astrocitos (Pellerin y col., 2007).

6. - SEÑALIZACIÓN

Los astrocitos juegan un papel muy importante en la regulación de la sinapsis. Controlan la concentración de neurotransmisores en la hendidura sináptica: 1) en el caso de amino ácidos (e.j.: glutamato, GABA, o monoaminas) a través de transportadores gliales específicos, y 2) en sinapsis colinérgicas los astrocitos sintetizan y secretan proteínas de unión a acetilcolina y atenúan así la señal sináptica. Por otro lado, los astrocitos controlan la sinapsis mediante gliotransmisores que tienen efectos sobre la sinapsis. Por ejemplo, la liberación de glutamato puede activar la secreción de GABA en interneuronas conectadas a neuronas piramidales. Por último, los astrocitos pueden modular la transmisión sináptica liberando ATP, que inhibe sinapsis glutamatérgicas a través de la catálisis de ATP a adenosina y actuando sobre receptores de adenosina (Auld y Robitaille 2003; Allen y Barres, 2005; Pascual y col., 2005; Halassa y Haydon, 2010).

La proximidad de los astrocitos en las sinapsis llevó a un nuevo concepto de organización sináptica conocido como la 'sinapsis tripartita'. En estas sinapsis participan el terminal presináptico, la membrana postsináptica neuronal y el astrocito. Los neurotransmisores se liberan del terminal presináptico y activan los receptores en las membranas postsináptica neuronal y perisináptica astrogliar. Esto genera un potencial postsináptico en las neuronas y señales de Ca^{2+} en los astrocitos. Esta señal de Ca^{2+} se puede propagar y puede liberar gliotransmisores que se dirigirán a los terminales pre y postsinápticos neuronales. Por lo tanto, en las sinapsis tripartitas existe una comunicación bidireccional entre las neuronas y los astrocitos (Araque y col., 1999; Volterra y Meldolesi, 2005).

3. Los filamentos de actina

3.1. La molécula de actina

La actina es una proteína globular de 43 kDa, y el componente principal de los filamentos. Además es la proteína más abundante en la mayoría de los tipos celulares. Su secuencia está muy conservada a lo largo de la evolución, existiendo en vertebrados seis isoformas, cada una codificada por un gen diferente (Yao y col., 1995). Las distintas isoformas son específicas de tejido, presentando las células de tejido muscular las isoformas α y γ , mientras que las células

no musculares poseen mayoritariamente las isoformas β y γ (Vanderkerckhore y Weber, 1984; Kovilur y col., 1993; Fagotti y col., 1998).

La actina puede existir en forma monomérica o globular (G-actina) y/o de forma filamentosa o polimerizada (F-actina). En la F-actina, los monómeros se ensamblan dando lugar a la formación de filamentos que cuentan con propiedades bioquímicas y biofísicas particulares. La transición de un estado a otro le confiere una gran flexibilidad y le permite participar de manera determinante en una gran cantidad de procesos celulares. Por eso mismo, la célula debe regular la actina disponible así como el estado (G- o F-actina) en que se encuentra. Para ello, además de las propiedades de la molécula de actina y de los filamentos que conforma, cuenta con la colaboración de proteínas que se unen a la actina.

La célula regula el proceso de polimerización para formar filamentos, así como la organización de esos filamentos para constituir unas estructuras u otras (el citoesqueleto de actina) (Chen y col., 2000; Rohn y Baum, 2010). Esta función en concreto compete a las proteínas de la familia de las RhoGTPasas, cuya actividad está gobernada por estímulos extracelulares que recibe la célula (explicado más ampliamente en el apartado 4). Además, existen proteínas motoras llamadas miosinas que se desplazan a lo largo de los filamentos de actina. Existen diversas miosinas y sus funciones son muy variadas, pero cabe destacar su papel en el movimiento de orgánulos, vesículas de transporte así como otras moléculas individuales (de Pina y Langford, 1999; Schliwa y Woehlke, 2003; Vale, 2003).

3.2. Proceso de polimerización de actina

Los filamentos de actina, también conocidos como microfilamentos (MF), son una estructura muy dinámica. La unión de cada monómero modifica su posición respecto al monómero anterior mediante sendos movimientos de traslación ($\approx 2,75$ nm) y de rotación ($\approx -166^\circ$), lo cual origina una hélice dextrógira de F-actina a partir de dos cadenas paralelas de G-actina polimerizada (Sheterline y col., 1995). Por lo tanto, una unidad de F-actina consiste en una hélice de diámetro estimado de entre 6 y 8 nm que contiene 28 moléculas de G-actina con una longitud de 72 nm por vuelta completa (Figura 10). La F-actina presenta una polaridad, en donde se distingue un extremo (+) y un extremo (-). Esta nomenclatura se debe a observaciones en el microscopio electrónico de MF decorados con fragmentos S1 de la cadena pesada de la miosina II, que confieren a la F-actina un aspecto similar a punta de flecha, correspondiendo la punta al extremo (-) o *pointed end* y la base al extremo barbado (+) o *barbed end* (Figura 10). Esta estructura polarizada de los filamentos aporta una vía a lo largo de la cual las miosinas pueden generar fuerzas en la dirección adecuada, del extremo (-) al (+).

Los monómeros de actina presentan una hendidura en el centro de la molécula a la que se une un ATP o ADP y a los cationes de Mg^{2+} y Ca^{2+} . Asimismo, la molécula de actina puede hidrolizar el ATP o intercambiar el ADP por el ATP (Figura 11). Inicialmente, en la polimerización la unión a Mg^{2+} y ATP activa la G-actina tras unos cambios conformacionales que le confieren capacidad

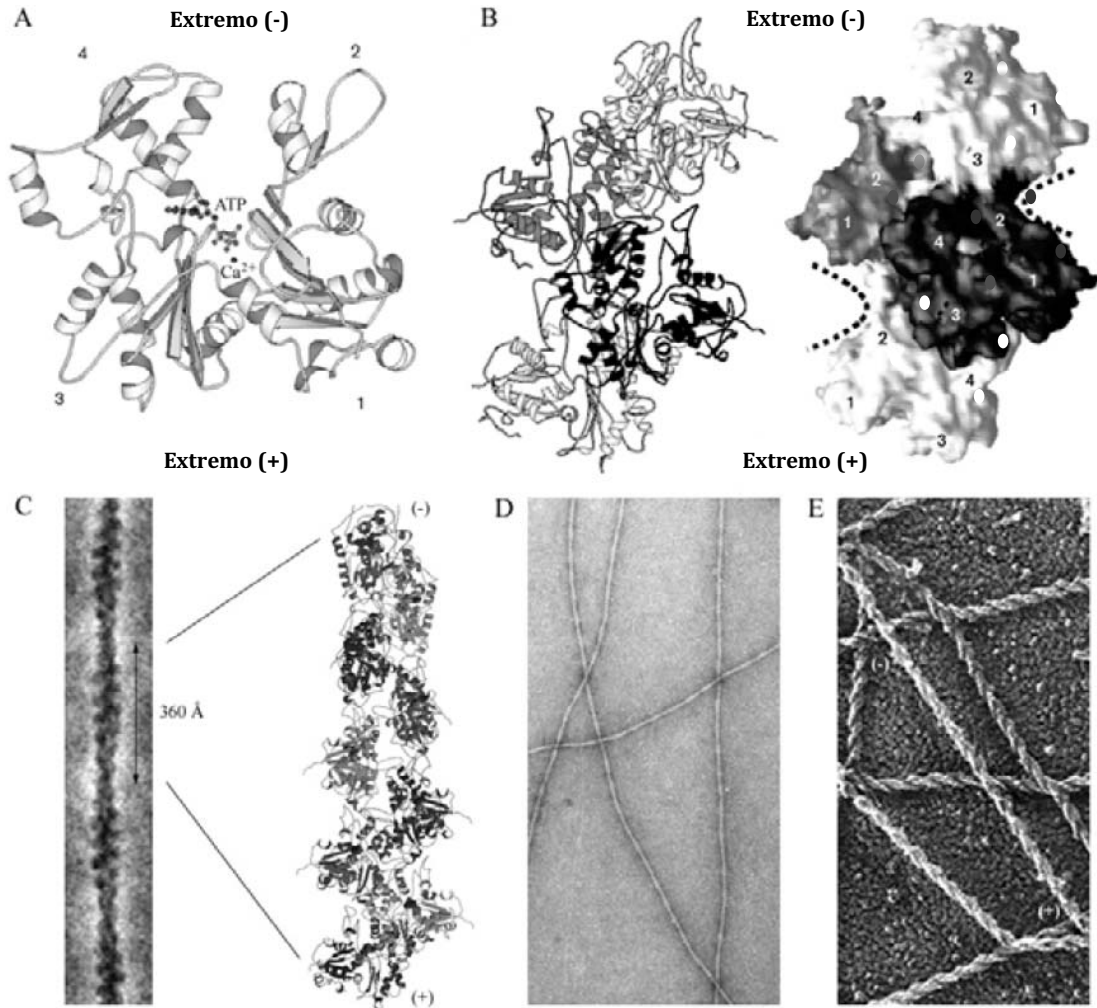


Figura 10. Estructura de la actina. A y B) Estructura de la molécula de actina. Las superficies cóncavas, marcadas por líneas discontinuas corresponden a los sitios de unión de proteínas. Los subdominios 1 y 3 es donde se añaden monómeros de actina y proteínas de coronado/bloqueo. Imágenes de microscopía electrónica que muestran la C) estructura de un filamento de actina, filamentos de actina estabilizados con faloidina y (D) filamentos decorados con fragmento S1 de la cadena pesada de la miosina II (E). Figura modificada de Holmes y col., 1990; Lorenz y col., 1993; Puius y col., 1998; Schoenenberger y col., 1999; Aguda y col., 2005.

de polimerizar. Seguidamente, tres monómeros de actina se unen entre sí para formar el oligómero o núcleo de polimerización en el proceso de 'nucleación'. Este proceso es desfavorable cinéticamente. Posteriormente, en la 'elongación', los monómeros activos, unidos a ATP se incorporan en el extremo (+) del filamento (Engel y col., 1977; Drenckhahn y Pollard, 1986), mientras que en el extremo opuesto o extremo (-) los monómeros hidrolizan el ATP a ADP+Pi (Figura 11). El ADP es retenido en el monómero de actina, el cual sufre un

cambio conformacional y es liberado del filamento. Ya libre, el monómero de actina puede volver a intercambiar ADP por ATP y volver a unirse al extremo (+) (Figura 11). En condiciones fisiológicas, las células mantienen constante el tamaño de los filamentos de actina alcanzando una fase de equilibrio de intercambio de monómeros de actina (Wegner, 1982; Nakajima y col., 1997). En estas condiciones la célula tiene una concentración estándar de actina (C_s), que permite la adición de monómeros de actina en el extremo (+) y la eliminación en el extremo (-), por lo que no se produce polimerización neta ya que ambos fenómenos quedan compensados (Figura 11). Para que se produzca la polimerización neta debe existir una concentración de actina superior a la concentración crítica o mínima (C_c). Como la C_c necesaria del extremo positivo es menor que la C_c necesaria del extremo negativo, la adición de monómeros de ATP-actina ocurre mayoritariamente por el extremo (+) y la despolimerización por el extremo (-) (Pollard, 1986; Carlier y Pantaloni, 1997; Cooper y Schafer, 2000).

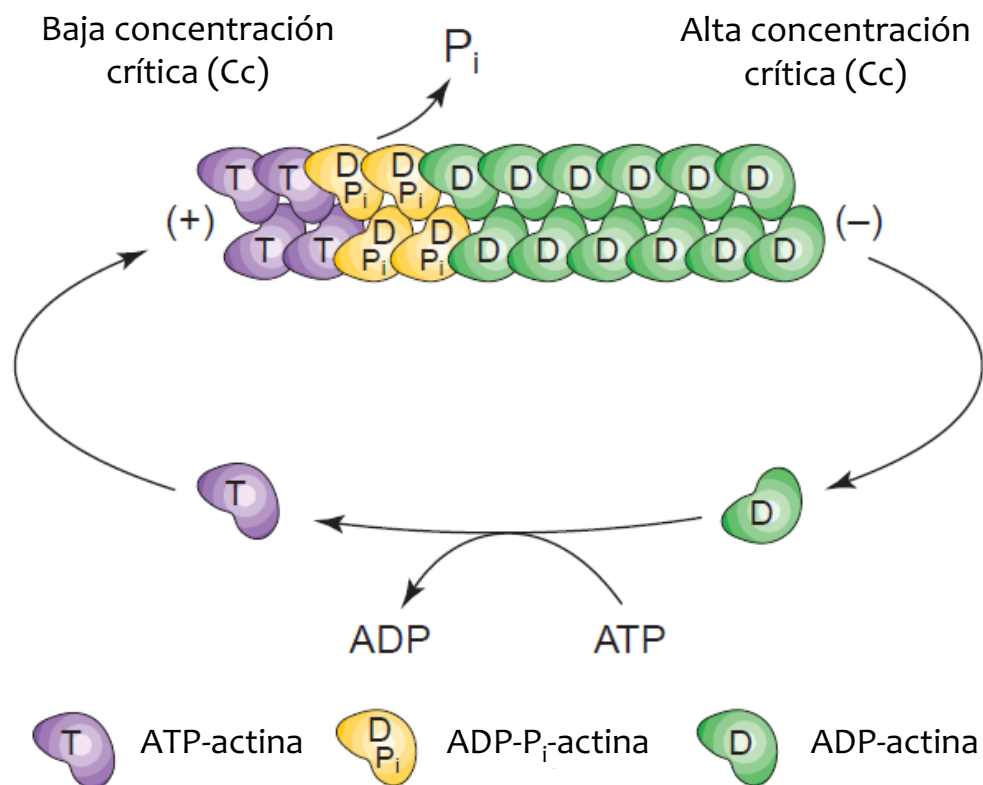


Figura 11. Dinámica de polimerización y despolimerización de actina. Recambio de monómeros de actina en un filamento en fase de equilibrio. Figura modificada de Chen y col., 2000.

3.3. Proteínas de unión a actina (ABPs)

En determinadas circunstancias es necesario que el recambio de monómeros de actina en el filamento ocurra a mayor velocidad que la habitual (e.j.: formación del lamelipodios en el

frente migratorio). La elongación del filamento depende de la concentración de G-actina libre en el medio. Para ello hay proteínas de unión a actina (ABPs) que secuestran monómeros de actina evitando la nucleación espontánea de nuevos filamentos. Como ejemplo de ello tenemos a la profilina y la timosina β -4. La profilina se une a monómeros unidos a ATP, mientras que la timosina β -4 además de unirse a ATP-actina bloquea las reacciones de ensamblaje de actina para formar el filamento (Safer y col., 1997). Sin embargo, la profilina puede desplazar a la timosina de su unión con el monómero. Esto permite a la célula tener una población de actina disponible para elongar los extremos (+) de los filamentos mientras que la timosina mantiene el resto de monómeros en reserva (Pollard y Borisy, 2003).

Para evitar que el reservorio de ATP-actina se agote en la célula debido a una polimerización constante existen dos mecanismos. El primero está regulado por las proteínas de coronado/bloqueo que se unen al extremo (+) de los filamentos de actina e impiden su elongación (Schafer y col., 1996). Como ejemplo tenemos a la proteína CapZ. El segundo mecanismo está mediado por la ADF/cofilina, que inhibe el intercambio de ADP por ATP en los monómeros inutilizándolos para elongar los filamentos. ADF/cofilina también se une a ADP-actina promoviendo su disociación y se mantiene unida evitando que puedan volver a ensamblarse por el extremo (+) de otro filamento. Además, la ADF/cofilina puede romper/cortar el filamento de actina, ya que al unirse lateralmente a los monómeros, la hélice del filamento se distorsiona generando tensiones que conducen a su ruptura. Por el contrario, las tropomodulinas bloquean el extremo (-) evitando así la despolimerización del filamento de actina (Fischer y Fowler, 2003).

La gelsolina es otra ABP especializada en romper y bloquear los filamentos de actina. Esta proteína se activa por Ca^{2+} y se une lateralmente a los monómeros de G-actina que constituyen el filamento, ocasionando su ruptura. Tras la ruptura se une al extremo (+) bloqueando la elongación del nuevo fragmento (Sun y col., 1999).

Otras acciones comunes de las ABPs son las de formar haces de actina mediante su unión a varios filamentos de actina (fimbrina, valina y fascina) (de Arruda y col., 1990; Yamashiro y col., 1998); entrecruzar filamentos dando lugar a la formación de redes (filamina y la α -actinina) (Matsudaira, 1991); y el unir los filamentos de actina con estructuras de membrana (ezrina-radixina-moesina - ERM) (Tsukita y Yonemura, 1999; Defacque y col., 2000).

3.4. Nucleadores de actina

La creación de nuevos filamentos de actina puede acontecer de dos formas diferentes: 1) mediante la formación *de novo* de un filamento, lo cual implica una 'nucleación' previa, o 2) a

partir de filamentos de actina preexistentes. Existen factores que promueven la formación de esos núcleos de polimerización (desfavorables cinéticamente) como son el complejo proteico Arp2/3 (Machesky y col., 1994), las forminas (Evangelista y col., 2003; Harris y Higgs, 2004; Kovar y Pollard, 2004) y los más recientemente descritos Spir y Cordon-bleu (Cobl) (Kerkhoff y col., 2001; Kerkhoff, 2006; Ahuja y col., 2007).

4. Las RhoGTPasas

La superfamilia de proteínas Ras engloba a 5 familias: Ras, Rho, Rab, Arf, y Ran (Figura 15) (Etienne-Manneville y Hall, 2002) que componen en mamíferos un total de 60 proteínas. Todas tienen en común que son proteínas monoméricas con pesos moleculares entre los 20 y 30 kDa (Bishop y Hall, 2000) y que son capaces de unir nucleótidos de guanina activándose o inactivándose en función de si están unidas a GTP o GDP, respectivamente.

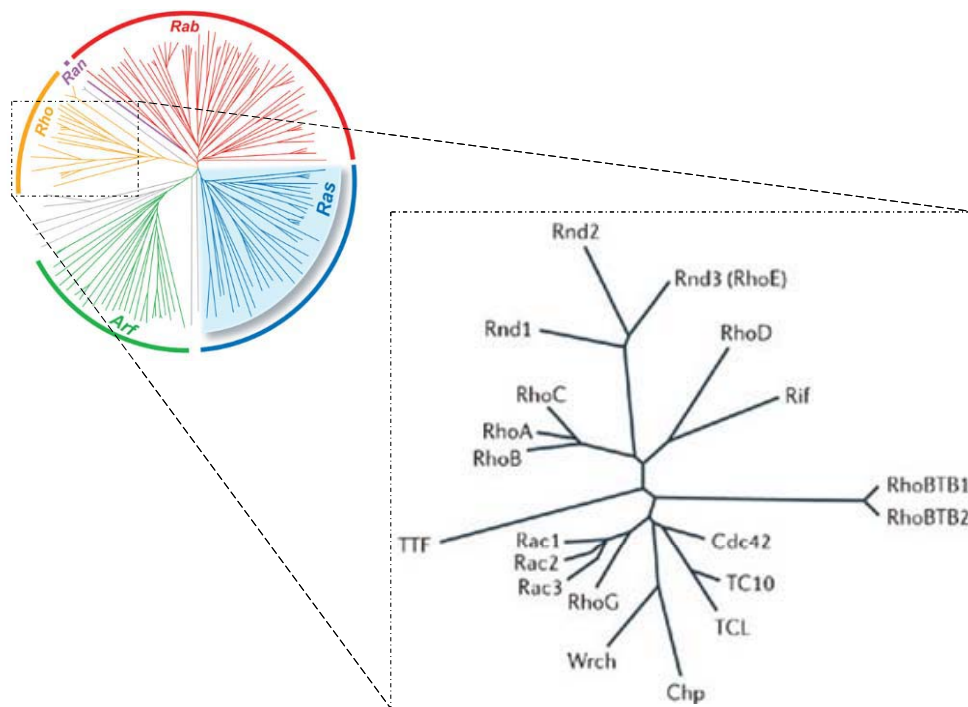


Figura 15. La familia de las proteínas Rho en humanos. Las RhoGTPasas son una subfamilia dentro de las RasGTPasas y consta de 21 miembros de características similares y funciones relacionadas. Figura modificada de Der, 2006 y Chardin, 2006.

Las Rho (*Ras homology*) GTPasas son una subfamilia de proteínas dentro de la familia de las Ras GTPasas, que engloba diferentes proteínas, de las cuales Rho, Rac y Cdc42 son las más

estudiadas (Figura 15). Actualmente, se conocen 20 genes de mamíferos que codifican para RhoGTPasas, existiendo tres isoformas de Rho (RhoA, RhoB y RhoC), tres isoformas de Rac (Rac1, Rac2 y Rac3), Cdc42, RhoD, tres isoformas de Rnd (Rnd1, Rnd2 y Rnd3/RhoE), RhoD, RhoG, TC10, TCL, TTF, Chp, Wrch, Rif y dos isoformas de RhoBTB (RhoBTB1 y RhoBTB2) (Jaffe y Hall, 2005). Tras diversos estudios se ha observado que estas proteínas están implicadas en la regulación del citoesqueleto, la polaridad celular, las rutas de transporte intracelular y varios procesos transcripcionales. Todas estas funciones tienen lugar cuando las RhoGTPasas están en su forma activa (unidas a GTP), debido a una interacción específica y conformacional con una diana efectora. Se han identificado unos 50 efectores para Rho, Rac y Cdc42 que incluyen quinasas de serina/treonina, quinasas lipídicas, lipasas, oxidasas y proteínas de andamiaje (Jaffe y Hall, 2005).

4.1. Dominios funcionales

Cuando las secuencias de Rho, Rac1 y Cdc42 se alinean con la secuencia de H-Ras, se observa una alta conservación de aquellos aminoácidos que se necesitan para la unión e hidrólisis de GTP (Figura 16).

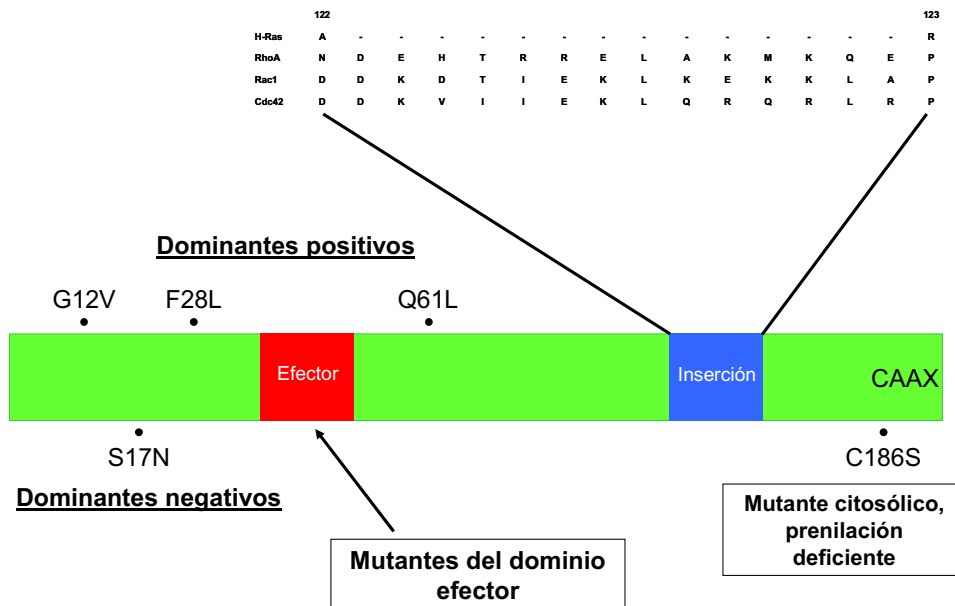


Figura 16. Dominios funcionales de RhoA conservados en otras RhoGTPasas. Contienen un dominio efector a través del cual se unen a todos los efectores de las Rho GTPasas. La región de inserción, no presente en la familia de Ras. Se muestran también las mutaciones activadoras (G12V y Q61L), F28L (rápido intercambio de GDP por GTP) y S17N (mutación que genera un dominante negativo). La región C-terminal (CAAX) es muy variable en las isoformas de Rac y Rho, y es la que sufre las modificaciones post-transduccionales esenciales para que las proteínas Rho se unan a membrana. Figura modificada de Karnoub y Der, 2003.

Una excepción sería la RhoGTPasa RhoH/TFF así como las RhoGTPasas de la subfamilia Rnd que presentan sustituciones en estos aminoácidos de manera que les confieren la particularidad de no tener capacidad de hidrolizar GTP. Por lo que se cree que su regulación se lleva a cabo a través del control de su expresión, fosforilación o ubiquitinación. Uno de los dominios más importante es el dominio efector a través del cual se unen todos los efectores de las RhoGTPasas (Figura 16). La especificidad de la interacción está garantizada ya que las proteínas efectoras se unen a residuos específicos dentro de este dominio. Sin embargo, el dominio que hace que las RhoGTPasas sean únicas dentro de la superfamilia de Ras es el dominio de inserción (Figura 16). Se trata de un dominio presente en todas las RhoGTPasas y ausente en Ras. Este dominio extra está implicado en la unión a determinados efectores (IQGAP1) y es el responsable de unir las proteínas reguladoras RhoGDIs (Wu y col., 1997), lo que comporta que los miembros de la familia de Ras no puedan unirse a las proteínas GDIs (Figura 16).

Al igual que otros miembros de la superfamilia Ras, las RhoGTPasas sufren modificaciones post-transduccionales como prenilación, carboximetilación de una cisteína muy conservada en el extremo C-terminal y la eliminación de los últimos tres aminoácidos de dicho extremo (Figura 16). De todas las modificaciones citadas, es de especial importancia la prenilación ya que facilita la unión de las RhoGTPasas a las membranas, determinando en algunos casos su localización subcelular. La prenilación puede ser por adición de un grupo farnesilo (Rho D, Rho E), adición de dos grupos geranilo (RhoA, Rho C, Rac1, Rac2 y Cdc42) o cualquiera de ambas modificaciones como es el caso de RhoB.

4.2. Localización subcelular

Las modificaciones post-transduccionales a las que se ven sometidas los miembros de esta familia de proteínas son un hecho clave que determina su localización dentro de la célula. Sin embargo, aunque se trata de un proceso común para todas las RhoGTPasas, existe una gran variabilidad en cuanto a su distribución subcelular, por lo que se cree que deben existir otros factores que influyan en su localización. Uno de estos factores sería la proteína RhoGDI, capaz de secuestrar la GTPasa en su estado inactivo y retenerla en el citoplasma. Esa gran diversidad en su localización, mayor incluso que en el caso de Ras, puede ser reflejo de la multitud de funciones biológicas en las que está involucrada esta familia de proteínas. Aunque existen numerosos estudios acerca de la localización subcelular de las RhoGTPasas (en especial sobre RhoA, Rac1 y Cdc42), la mayoría de los datos obtenidos hasta el momento son confusos e incluso en algunos casos contradictorios. Estudios de fraccionamiento celular demuestran que

las proteínas endógenas RhoA, Rac1 y Cdc42 se localizan en citosol y en fracciones totales de membrana (Boivin y Beliveau, 1995), y al activarse se translocan a endomembranas (Fleming y col., 1996; Kranenburg y col., 1997; Michaelson y col., 2001). En el caso de Cdc42 se confirmó que parte de las fracciones de membrana se correspondían con las membranas del complejo de Golgi (Erickson y col., 1996; Fuccini y col., 2002; Luna y col., 2002). En cuanto a Rac1, mediante inmunofluorescencia se ha observado que una forma mutante constitutivamente activada (RacV12) se localiza en membrana plasmática y en membranas intracelulares (Jou y col., 2000), además de su localización en núcleo (Michaelson y col., 2001; Kraynov y col., 2000). En el caso de Rho, como se ha comentado en el apartado anterior, las diferencias entre la prenilación C-terminal de RhoA y RhoC respecto a RhoB conlleva a diferentes localizaciones subcelulares. Por lo tanto, encontramos principalmente a RhoB en endosomas tardíos y lisosomas, y a RhoA y RhoC en membrana plasmática y el citoplasma (Wheeler y Ridley, 2004). También se han realizado estudios sobre la localización subcelular de otras isoformas menos conocidas de Rac y Rho. En células en reposo, Rac2 se encuentra asociado a RhoGDI en el citosol (Knaus y col., 1991). Tras su activación *in vitro* se transloca a la membrana plasmática (Philips y col., 1993). Por otro lado, Rho D ha sido descrita como una proteína endosomal ya que se encuentra en estructuras vesiculares que contienen transferrina internalizada (Murphy y col., 1996).

4.3. Ciclo funcional de las RhoGTPasas

Las GTPasas funcionan como interruptores binarios, activos en su forma unida a GTP e inactivos en la forma unida a GDP. El ciclo entre el estado activo (unido a GTP) y el inactivo (unido a GDP) está regulado por factores intercambiadores de GTP/GDP (GEFs, *Guanine Nucleotide Exchange Factors*) (Figura 17). La consecución del estado inactivo se adquiere por la hidrólisis del GTP catalizada por la actividad intrínseca de la GTPasa y favorecida por las proteínas GAP (*GTPase-Activating Proteins*) (Figura 17). Las RhoGTPasas también se unen a los GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*), proteínas citoplasmáticas tradicionalmente descritas como secuestradoras de RhoGTPasas inactivas (unidas a GDP) uniéndose a su prenilación y deslocalizándolas de la membrana hacia el espacio citoplasmático (DerMardirossian y Bokoch, 2005) (Figura 17).

4.3.1 Guanine Exchange Factors (GEFs)

La tasa intrínseca de intercambio de nucleótidos en la RhoGTPasas es muy baja a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} (Self y Hall, 1995). Únicamente, se ha descrito que al modificar una Phe por una Leu en el aminoácido 28 de Cdc42, se puede conferir un nivel de

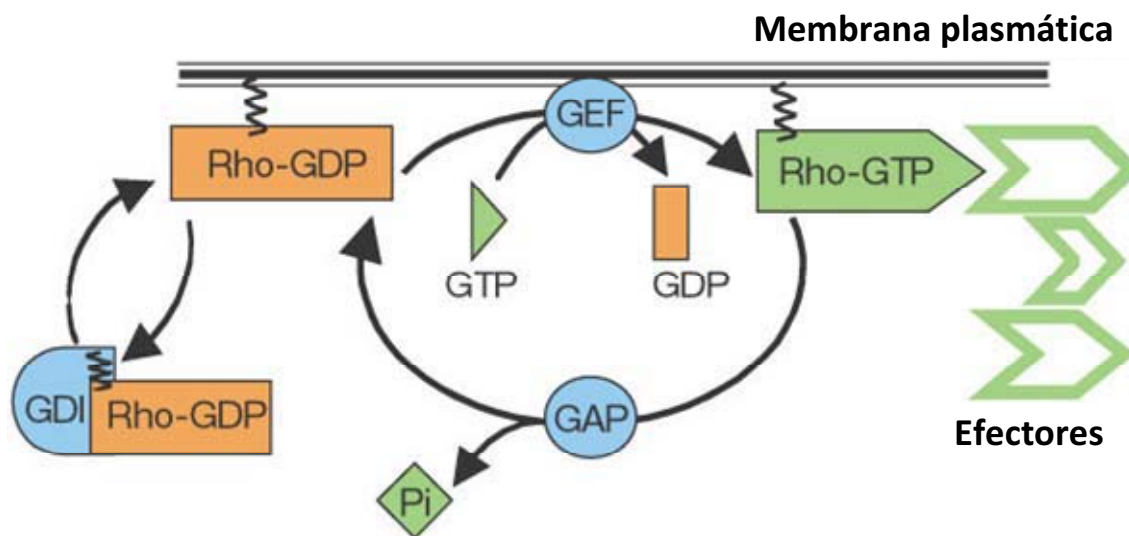


Figura 17. Ciclo de activación y desactivación de las RhoGTPasas. Las RhoGTPasas en su estado activo están unidas a GTP, gracias a las proteínas GEF, y ancladas en la membrana plasmática a fosfolípidos específicos. La inactivación se consigue en dos etapas, la primera en que las proteínas GAP hidrolizan el GTP, transformándolo a GDP y la segunda cuando las proteínas GDI reclutan la RhoGTPasa inactiva hacia el citosol. Figura modificada de Etienne-Manneville y Hall, 2002.

intercambio (GDP/GTP) intrínseco muy elevado (Lin y col., 1997). Salvo en casos como este, habitualmente el intercambio de GDP a GTP lo realizan los GEFs (Figura 17), actualmente se han descrito unos 85 distintos (Jaffe y Hall, 2005). Los GEFs contienen varios dominios, el dominio de homología a Dbl (DH) es el que le confiere la capacidad de intercambiar GDP por GTP. De forma adyacente contiene otro dominio de homología a plekstrina (PH) que tiene la función de localizar, orientar y activar a GEFs, uniéndolos al $PI(3,4,5)P_3$ de la membrana plasmática (Erickson y Cerione, 2004). Además, estas proteínas contienen otros dominios adicionales, los SH2 y SH3 que permiten la interacción y formación de complejos con otras moléculas (Cerione y Zheng, 1996). Los diferentes tipos de GEFs muestran especificidad por diferentes subgrupos de RhoGTPasas y su expresión en muchos casos se ve reducido a poblaciones celulares concretas (e.j.: Vav en células hematopoyéticas; Tiam-1 en cerebro) (van Elst y d'Souza-Schory, 1997; Habets y col., 1995). La actividad de las proteínas GEF está

regulada por un cambio conformacional, que trunca la región N-terminal inhibitoria (Erickson y Cerione, 2004) en la que están involucrados los dominios PH (Han y col., 1998).

Los dominantes negativos de las RhoGTPasas suelen tener una modificación en el aminoácido 17, intercambiando una Thr por una Asn, lo cual interfiere en la unión del Mg^{2+} (crucial para la unión de los GEF) y en la unión del nucleótido (Bourne y col., 1991).

4.3.2 Hidrólisis de GTP y *GTPase Activating Proteins (GAPs)*

Una vez una RhoGTPasa está activada (unida a GTP) esta actividad termina al hidrolizarse el GTP, dando como producto GDP y fosfato libre (Figura 17). Todas las RhoGTPasas tienen una tasa intrínseca de hidrólisis de GTP, que se ve incrementada por las proteínas GAP. La mutación en diversos aminoácidos provoca la pérdida de esta hidrólisis propia o mediante GAP, manteniendo las proteínas predominantemente en un estado unido a GTP. Proteínas con mutaciones en el aminoácido 12, de Gly a Val, o del aminoácido 61 de Glu a Leu, son los más utilizados como proteínas constitutivamente activadas de las RhoGTPasas.

Todas las GAPs contienen una región conservada de 140 aminoácidos conocida como el dominio GAP, que le confiere la actividad GAP. Estos dominios GAP van acompañados de otros dominios reguladores de dicha actividad (Kozma y col., 1996). La regulación de las GAPs en el interior de las células es un campo poco conocido. Se sabe que cambios en la localización celular, concretamente en la translocación a membrana plasmática, implica su activación de ciertas GAPs (Bradley y col., 2006). Este cambio en la localización subcelular está relacionado con un aumento de la capacidad de unión por su sustrato, ya que las RhoGTPasas unidas a GTP se localizan en la membrana (Noren y col., 2003; Barberis y col., 2005). Por otro lado, también se han descrito ciertas proteínas con capacidad para unirse a GAPs y activarlas. Entre éstas están p120RasGAP mediante su dominio SH2 (Bradley y col., 2006), la quinasa de adhesiones focales (FAK) (Tomar y col., 2009) y p120-catenina (Wildenberg y col., 2006). La activación por fosforilación es quizás la regulación más extendida y conocida entre las diferentes GAPs. Por ejemplo, las RhoGAPs p190, p200 o p250 se activan mediante fosforilación de residuos de tirosinas de la familia Abl o Src (Brouns y col., 2001; Moon y col., 2003; Taniguchi y col., 2003; Hernández y col., 2004). En el caso concreto de p190RhoGAP también se ha descrito la activación por fosforilación de los residuos de serinas a través de PKC y ROCK (Brouns y col., 2000; Mori y col., 2009). Existen otras RhoGAPs activadas mediante fosforilación de sus residuos de serinas a través de MAPK, CDPKII, Aurora B (Taylor y col., 1998; Minoshima y col., 2003). Otras formas de regulación de la actividad RhoGAP no tan conocidas son la interacción con GEFs, vía el dominio SH3 (Jenna y col., 2002), o mediante autorregulación adquiriendo

conformaciones autoinhibitorias, como es el caso de OPHN-1 y α 2-chimaerin (Fauchereau y col., 2003; Brown y col., 2004).

4.3.3 *Guanine Dissociation Inhibitors (GDIs)*

Las *Guanine Dissociation Inhibitors* (GDIs), tienen una elevada afinidad por las RhoGTPasas preniladas. Tradicionalmente, se postula que las GDIs movilizan las RhoGTPasas inactivadas al citoplasma previniendo la unión a GTP por parte de las GEFs, hasta que un estímulo apropiado las devuelve a la membrana para activarse (Takai y col., 1995) (Figura 17). De hecho, la sobreexpresión de GDIs inhibe las rutas de señalización de las RhoGTPasas implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina (Nishiyama y col., 1994; Coso y col., 1995). Los GDIs, uniéndose a la prenilación del C-terminal mantienen las RhoGTPasas en el citoplasma (Figura 17). Estudios de cristalografía indican que el C-terminal de los GDIs contiene un hoyuelo hidrofóbico para unir isoprenos que es el que le confiere esta capacidad. Recientemente, se ha descrito la posibilidad de que los RhoGDIs realicen el efecto contrario, uniéndose a la RhoGTPasa activa con la finalidad de evitar su inactivación por parte de RhoGAPs (Dransart y col., 2005; DerMardirossian y col., 2005)

Se han caracterizado tres tipos de GDIs específicos para la familia Rho en mamíferos: 1) RhoGDIs que se expresan de forma ubicua y son muy activos frente a RhoA, Cdc42 y Rac (Gorvel y col., 1998), 2) D4/LyGDI se expresa sólo en células hematopoyéticas y tiene una actividad menor frente a RhoA, Cdc42 y Rac debido a la ausencia de hoyuelo hidrofóbico (Platko y col., 1995; Gosser y col., 1997), y 3) GDI γ /RhoGDI-3 se expresa principalmente en el cerebro y el páncreas y se asocia a membrana con gran afinidad por RhoGTPasas farnesiladas (Lelias y col., 1993; Scherle y col., 1993).

En el proceso de translocación de proteínas de la membrana al citoplasma, a GDIs interaccionan con las proteínas ERM. Además, las proteínas ERM interaccionan con GEFs, con lo que se puede especular que las proteínas ERM pueden ser capaces de regular la liberación de RhoGTPasas y el paso de GDP a GTP.

4.4. Funciones biológicas

Dentro de la familia de las RasGTPasas, cada subfamilia estimula una vía de señalización específica. Así, los miembros de la familia de las RhoGTPasas regulan la organización del citoesqueleto de actina, los miembros de la familia de Ras controlarían la proliferación celular,

los componentes de las familias de Rab y Arf participarían en el tráfico intracelular regulando los movimientos de vesículas entre distintos orgánulos y finalmente los miembros de la familia Ran intervienen en el transporte entre el núcleo y el citoplasma (Der y Balch, 2000). Sin embargo, las RhoGTPasas, cuando se activan de manera aberrante son capaces de inducir transformación celular (Zohn y col., 1998) al igual que ocurre con los miembros de la familia de Ras. Por otro lado, las RhoGTPasas también pueden estar implicadas en transporte intracelular como los miembros de Arf (Wu y col., 2000; Fuccini y col., 2002; Luna y col., 2002).

4.4.1. Organización del citoesqueleto de actina

Los primeros estudios con RhoGTPasas revelaron que cuando se estimulaban con agonistas como el ácido lisofosfatídico (LPA) se producía un incremento en las fibras de estrés y adhesiones focales debido a la activación de Rho (Ridley, 1999). De estos resultados se concluyó que Rho regulaba una vía de señalización que une los receptores de membrana con el citoesqueleto de actina (Figura 18). Posteriormente, se observó que Rac podía ser activado por varios agonistas como EGF, PDGF o insulina. En cualquier caso su activación conducía al ensamblaje de una red de filamentos de actina en la periferia celular para producir lamelipodios y/o ondulaciones de membrana (Ridley y col., 1992; Hall, 1998; Figura 18). Finalmente se describió que el tercer miembro más conocido de esta familia, Cdc42, era capaz de inducir la formación de protrusiones filiformes, en la superficie celular, ricas en actina y conocidas como filopodios (Hall, 1998; Kozma y col., 1995; Figura 18).

Todos estos efectos de las distintas RhoGTPasas sobre el citoesqueleto de actina están muy conservados en todas las células eucariotas.

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Rho

La capacidad de Rho de inducir la polimerización de actina es bastante controvertida. De hecho se postula que la formación de fibras de estrés inducida por Rho tiene lugar no a través de la síntesis *de novo* de filamentos, sino mediante el ensamblaje de filamentos de actina ya formados. Las fibras de estrés son estructuras contráctiles altamente ordenadas que constan de filamentos de actina colocados de forma antiparalela, proteínas que unen microfilamentos y miosina II. Estas fibras aparecen en células en cultivo, una vez se han adherido al sustrato. El final de una fibra de estrés conecta con los contactos focales, formados por múltiples proteínas de unión a la matriz extracelular. La tensión que ejercen las fibras de estrés es lo que permite que la fuerza generada por las miosinas, y el crecimiento y reorganización de los filamentos mueva y moldeé las células.

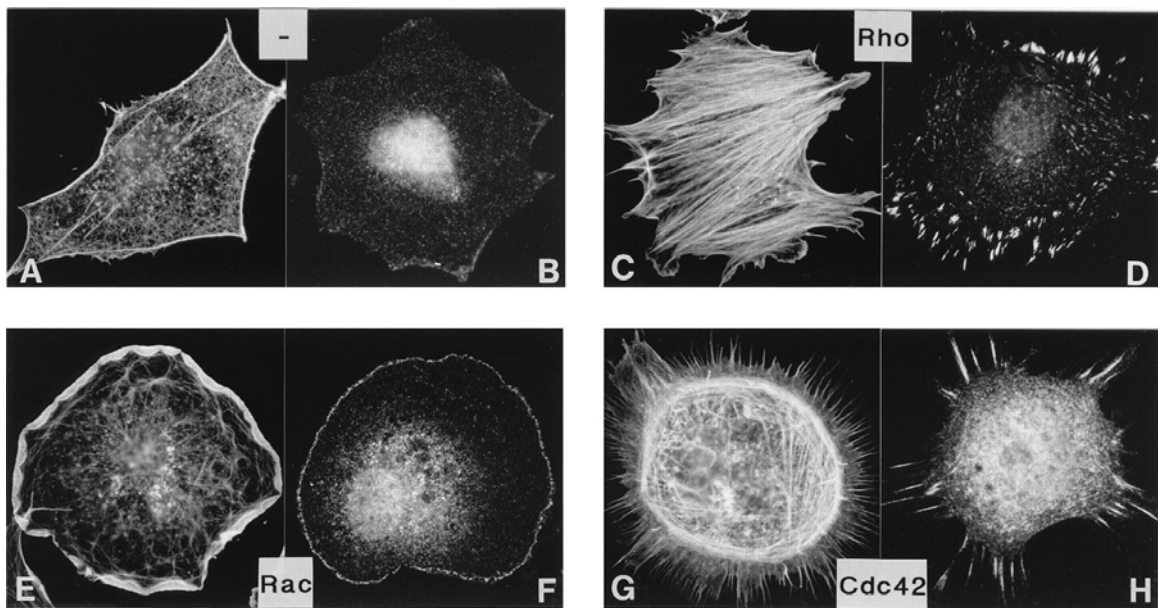


Figura 18. Regulación del citoesqueleto de actina por las RhoGTPasas. Las RhoGTPasas controlan y alteran la organización del citoesqueleto de actina en función de las demandas celulares. Asimismo, están encargadas de formar fibras de estrés (Rho), lamelipodios y/o ondulaciones de membrana (Rac), y filopodios (Cdc42). La figura muestra inmunofluorescencias del citoesqueleto de actina y contactos focales de fibroblastos de ratón, imágenes obtenidas de Hall, 1998.

Las fibras de estrés se dividen en tres clases de en función de la localización subcelular: fibras de estrés ventrales, dorsales y arcos transversales (Pellegrin y Mellor, 2007). Las fibras ventrales son las más comunes, yacen en la base de la célula unidas a adhesiones focales (en ambos extremos) y se forman a partir de la unión de fibras dorsales. Las fibras dorsales están unidas a contactos focales solamente en un extremo, uniéndolas a la base de la célula. Éstas se forman a partir de los contactos focales y forman filamentos cortos que contienen α -actinina. El resto de estructuras aparecen en la zona dorsal celular, terminando en una amplia red de filamentos de actina. Los arcos transversales se forman debajo de la superficie dorsal de células en migración, justo por detrás de los lamelipodios. Estos arcos puede se originan de la unión de haces cortos de actina a haces de miosina, o a partir de la acción de miosinas sobre redes de actina pre-existentes (Hotulainen y Lappalainen, 2006).

El nivel de polimerización de actina en respuesta a la activación exclusiva de Rho es relativamente pequeño (Machesky y Hall, 1997; Hall, 1998), y se sabe que al menos dos efectores son necesarios para que Rho pueda ejercer su efecto en el citoesqueleto de actina: Rho quinasa (ROCK) y mDia.

ROCK incluye dos serina-treonina quinasas conocidas como p164ROK α y p160ROK β . ROCK se activa tras su unión a Rho-GTP inhibiendo la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) lo que da lugar a la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) lo que a su vez potenciaría la activación de la miosina. Además, ROCK es también capaz de fosforilar directamente a la MLC. Por tanto, Rho promueve la contracción dependiente de miosina dando lugar a un incremento en la tensión que conduce a la formación de fibras de estrés y de adhesiones focales (Figura 18). Aunque ROCK es esencial para la formación de las fibras de estrés dependientes de Rho, su única activación no es suficiente (Sahai y col., 1998).

Una segunda diana de Rho es mDia, una proteína capaz de unirse a la profilina y a la G-actina. mDia es el homólogo en mamíferos de la proteína *Diaphanous* en *Drosophila* necesaria para la citoquinesis. mDia así como *Diaphanous* son miembros de la familia de las forminas (Li y Higgs, 2003). Se postula que mDia estaría implicada en la correcta organización de las fibras de estrés. Así, cuando se sobreexpresan mDia y ROCK, el aspecto de las fibras de estrés es el habitual (Watanabe y col., 1999).

Otra dianas efectoras de Rho es LIMK, una quinasa que puede ser fosforilada y activada por ROCK y también por PAK, el principal activador de Rac y Cdc42, revelando así un punto de convergencia entre las vías de Cdc42, Rac y Rho. La activación de LIMK estabiliza los filamentos de actina ya sean los que constituyen las fibras de estrés o los que aparecen en la zona subcortical de la membrana plasmática. La quinasa Citron y la fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa (PI-4P5K) son otras dianas de Rho que también participan en la organización del citoesqueleto de actina.

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Rac

La sobreexpresión de Rac causa la formación de ondulaciones de membrana que están íntimamente relacionadas con los lamelipodios (Figura 18). Los lamelipodios son proyecciones transitorias del citoesqueleto de actina en el frente migratorio. Su estructura es ancha y de forma laminar. Éstos contienen una red de actina que propulsa la célula a través de un sustrato. Dentro de los lamelipodios existen los micropuntos que cuando se extienden más allá de la frontera de los lamelipodios pasan a llamarse filopodios. Los lamelipodios se originan a partir de nucleación de actina en la membrana celular, la cual es el principal área de formación de microfilamento de la célula. Los lamelipodios a menudo acaban evolucionando hacia ondulaciones de membrana cuando dichas protrusiones dejan de estar adheridas y se repliegan sobre la superficie celular. Mientras que el papel de Rho como activador de la polimerización de actina es bastante controvertido, Rac es un conocido activador de dicha polimerización. Al igual que ocurre con Rho, Rac puede estimular la actividad de PI-4P5K

(Tolias y col., 2000) incrementando así los niveles de PI(4,5)P₂. Actualmente se considera que Arp2/3 es el principal efector de Rac para inducir la polimerización de actina en el frente de avance, activándolo a través de las proteínas Scar/WAVE. Otro efector menos conocido de Rac es la proteína POR1 que se ha implicado en la formación de los lamelipodios (van Aelst y col., 1996).

Reorganizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Cdc42

Estudios de transfección y microinyección han demostrado que Cdc42 induce la formación de filopodios y microespinas (Kozma y col., 1995; Nobes y Hall, 1995). Los filopodios son delgadas protrusiones de membrana surcadas en su interior por largos filamentos de actina dispuestos paralelamente y en apretados haces (Small y col., 1978; Lewis y Bridgman, 1992; Small y col., 2002) entrecruzados por ABPs. Las microespinas por su parte son haces paralelos de filamentos de actina pero en los lamelipodios (Svitkina y col., 2003). La función biológica de estas estructuras podría ser la de jugar un papel sensorial más que constituir una fuerza propulsora en los procesos de migración. Estas organizaciones del citoesqueleto de actina inducidas por Cdc42 están mediadas por N-WASP y Arp2/3 aunque este último parece ser que sólo participa en el inicio de la formación de los filopodios tras lo que se disocia rápidamente (Svitkina y Borisy, 1999).

4.4.2 Adhesión celular

El citoesqueleto de actina está unido estructuralmente a puntos tanto de adhesión intercelular como de adhesión de la célula con la matriz extracelular. Algunas proteínas que ejercen como matriz extracelular son fibronectina, colágeno, laminina y filamina. Al estar implicadas en la organización del citoesqueleto de actina, las RhoGTPasas inevitablemente regulan estos lugares de unión. Concretamente, Rho está implicada en la adhesión mediada por integrinas. Cuando la célula se adhiere a fibronectina se forman las fibras de estrés y los contactos focales, y múltiples proteínas implicadas en estos contactos focales se fosforilan en residuos de tirosinas induciendo la activación de rutas como la de las MAPK o la transcripción de determinados genes. En todos estos procesos RhoA está implicada (Wheeler y Ridley, 2004). Un efector de RhoA implicado en la señalización de integrinas es el intercambiador iónico (Na⁺/H⁺) NHE1 localizado en los contactos focales (Tominaga y Barber, 1998) regulando su formación y el ensamblaje de las fibras de estrés. ROCK está descrito como posible fosforilador y activador de NHE1 (Tominaga y col., 1998). Por otro lado, Rac y Cdc42 también pueden mediar la formación de contactos focales en estructuras como lamelipodios o filopodios, pero

son contactos más pequeños que los inducidos por Rho (Nobes y Hall, 1995). Además, el aposentamiento de las células sobre el sustrato es dependiente de Rac y Cdc42 (Clark y col., 1998; Price y col., 1998). De hecho PAK1 es diana de ambas RhoGTPasas, activándose justo después de la adhesión (Price y col., 1998).

Las RhoGTPasas también están implicadas en las uniones entre células. Estas uniones pueden ser 1) adherentes, en las cuales están implicadas las proteínas cadherinas, o 2) de uniones estrechas, barreras impermeables donde no se permite el paso de macromoléculas y en las que están implicadas proteínas transmembranales como ZO-1, ZO-2, ocludinas y claudinas. Todas estas uniones están ligadas al citoesqueleto de actina (Figura 19). Rac se localiza en las uniones entre células epiteliales, ya que está implicada en la regulación de su integridad (Figura 19). Esta RhoGTPasa además promueve la formación de actina cortical en células epiteliales, reforzando las uniones entre ellas (Wojciak-Stothard y Ridley, 2002) (Figura 19).

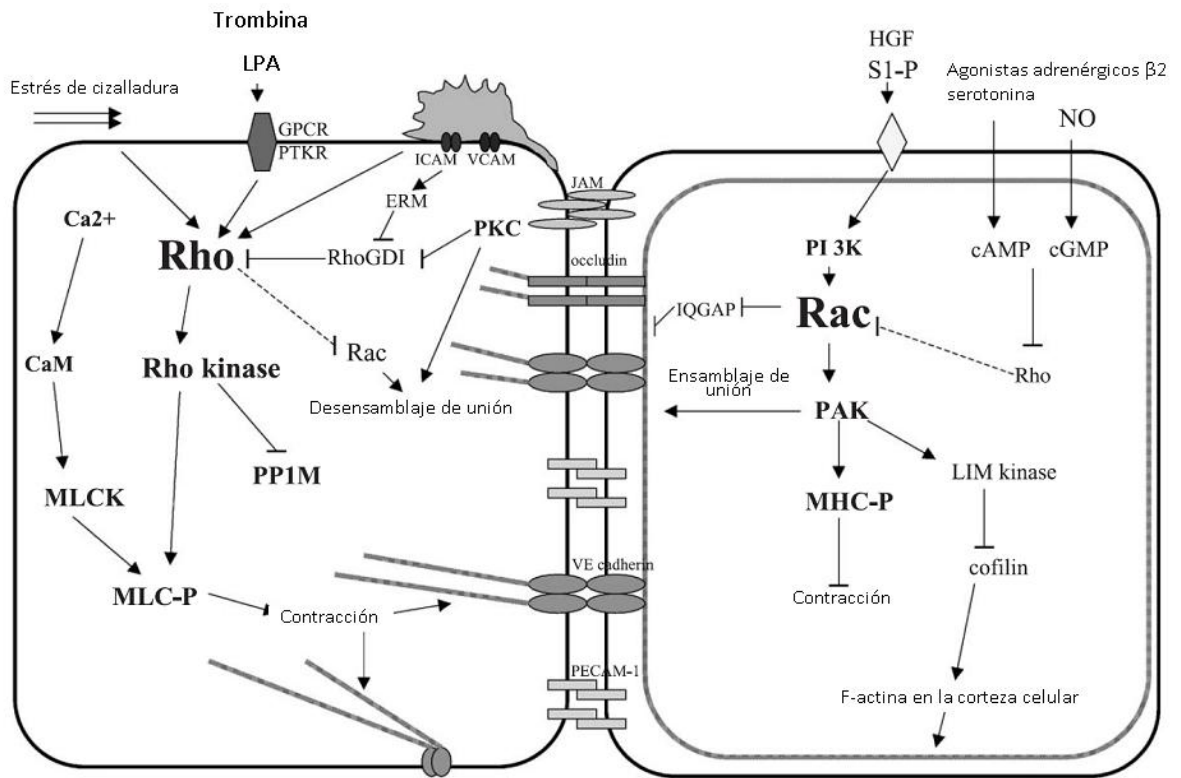


Figura 19. Implicación de las RhoGTPasas en la adhesión celular. La adhesión celular está regulada por un diálogo constante entre las RhoGTPasas Rho y Rac. En el diagrama observamos múltiples proteínas implicadas en esta coordinación de la regulación en las uniones intercelulares. Figura obtenida de Wojciak-Stothard y Ridley, 2002.

4.4.3 Migración celular

La migración en células animales está dirigida por estímulos extracelulares que actúan como repelentes o atrayentes (Raftopoulou y Hall, 2004). Para que la célula pueda migrar, es

imprescindible que adopte una morfología polarizada, con una parte frontal que se extiende e indica la dirección de avance, y una parte trasera que se contrae y sigue al frente de avance (Ridley, 2001). Rac se necesita en el frente celular para regular la polimerización de actina que dará lugar a la formación del lamelipodios. Es pues la encargada de inducir la formación de una morfología polarizada. Rho por su parte es requerida para regular las fuerzas de contracción y de retracción en la parte trasera de la célula (Raftopoulou y Hall, 2004). Por lo tanto, este es otro ejemplo del diálogo continuo y regulatorio existente entre Rac y Rho. En lo que respecta a Cdc42 y al igual que Rac, se necesita en el frente de avance donde induce la polimerización de actina para formar los filopodios (Nobes y Hall, 1995). Sin embargo, estas delgadas protrusiones no son imprescindible para que se lleve a cabo la migración (Sepp y Auld, 2003).

4.4.4 Tráfico intracelular

Las primeras evidencias de que las RhoGTPasas estaban implicadas en el tráfico de membranas proceden de estudios sobre su localización: primero se localizó a RhoB en los endosomas tardíos y en los lisosomas (Adamson y col., 1992) y un poco más tarde se describió que Cdc42 estaba asociada al aparato de Golgi (Erickson y col., 1996). Posteriormente han ido apareciendo multitud de evidencias que indicaban que el citoesqueleto de actina también está implicado en el tráfico vesicular (Qualmann y col., 2000; Matas y col., 2004; Hehnly y col., 2006; Luna y col., 2002) y que por tanto, ciertas RhoGTPasas podían estar directamente implicadas como reguladoras de la movilidad de las vesículas dependiente de actina. Actualmente, se confirma que de forma diversa las RhoGTPasas están implicadas en todas las etapas del tráfico intracelular. En la endocitosis por pinocitosis y fagocitosis (no dependientes de clatrina) son imprescindibles tanto el citoesqueleto de actina como Rac1 y Cdc42. Otros estudios ponen de manifiesto la importancia de Cdc42 durante el transporte de proteínas a nivel del complejo de Golgi (Erickson y col., 1996). La forma activa de Cdc42 es reclutada a las membranas de Golgi a través de su unión con el coatómero (Wu y col., 2000; Fuccini y col., 2002) y una vez allí estimula la polimerización de actina (Fuccini y col., 2002; Chen y col., 2004) reclutando N-WASP (Luna y col., 2002; Matas y col., 2004).

5. Los fosfoinosítidos

El cerebro presenta una composición lipídica única, en relación con otros órganos, donde destacan los niveles elevados de colesterol y ácidos grasos polinsaturados (Dietschy y Turley, 2004). Además de ejercer una función estructural, éstos están implicados en la fisiología cerebral, como por ejemplo en el proceso de mielinización (Garbay y col., 2000), el crecimiento de las neuritas (Vance y col., 2005), la sinaptogénesis (Slezak y Pfrieder, 2003) y la señalización celular (Bazan, 2003).

Los componentes esenciales de las membranas biológicas son los fosfolípidos, moléculas anfipáticas que poseen una cabeza polar y una cola hidrofóbica, y en el caso de los glicerofosfolípidos, unidos por un esqueleto de glicerol. En las membranas celulares se pueden encontrar más de 1000 tipos de glicerofosfolípidos, una heterogeneidad resultante de la presencia de diferentes ácidos grasos en posición sn-1 y sn-2 del glicerol y de diferentes cabezas polares en la posición sn-3. La cabeza es el componente que define la naturaleza del glicerofosfolípido.

La fosfatidilcolina (PC) es el glicerofosfolípido más abundante y representa un 40-50 % de los fosfolípidos de membrana. Le sigue la fosfatidiletanolamina (PE) con un 20-50% dependiendo del tejido. Otros glicerofosfolípidos que aparecen con menos frecuencia son la fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y la cardiolipina (CL). La composición de las membranas dependerá de las transformaciones metabólicas y procesos de transporte de fosfolípidos que ocurran, propios de cada célula u orgánulo (Voelker, 2003; Devaux y col., 2008). En función de su composición las membranas tendrán unas características fisicoquímicas como la fluidez, permeabilidad, curvatura, carga, compactación molecular o grado de hidratación que serán determinantes en su función celular y modularán la actividad de las proteínas de membrana. Por otro lado, los fosfolípidos participan en diversas rutas metabólicas como precursores de segundos mensajeros o actuando sobre determinadas proteínas. El ácido lisofosfatídico (LPA) actúa sobre receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas que desencadenan multitud de señales intracelulares (Mills y Moolenaar, 2003).

El PI y sus fosforilaciones derivadas, los fosfoinosítidos, son una de las moléculas más versátiles y reguladoras de las células eucariotas. Intervienen en procesos como el tráfico de membranas, señalización intracelular, organización de citoesqueleto y apoptosis (Niggli, 2005; di Paolo y de Camilli, 2006). Además contribuyen a la patogénesis de diferentes enfermedades jugando un papel importante en procesos inflamatorios, cáncer y enfermedades metabólicas (Wymann y Schneider, 2008).

5.1. Tipos de fosfoinosítidos

El fosfatidilinositol (PI) se compone de un D-myo-inositol-1-fosfato unido a diacilglicerol. PI se sintetiza principalmente en el retículo endoplasmático (RE) y es enviado a otras membranas a través de transporte vesicular o por proteínas citosólicas transportadoras de PI. El PI puede fosforilarse de forma reversible en las posiciones D-3, D-4, D-5 generando siete especies distintas de fosfoinosítidos [PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(3,5)P₂, PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃] (Figura 20) que sirven como plataforma de anclaje a membrana para un elevado número de proteínas. Los fosfoinosítidos (PIPs) se encuentran en la membrana plasmática, endosomas, RE, aparato de Golgi y envoltura nuclear. PI y sus derivados componen aproximadamente un 10% de todos los lípidos celulares. Los derivados fosforilados más abundantes son PI(4)P y PI(4,5)P₂ comprendiendo un 0,5 % de todos los lípidos en células de mamífero (Mitchell y col., 1986; Hagelberg y Allan, 1990; Tran y col., 1993). Aunque la concentración de PI(4,5)P₂ es constante se han descrito variaciones locales en zonas de fagocitosis y en protrusiones ricas en actina como ondulaciones de membrana (Botelho y col., 2000; Ling y col., 2006).

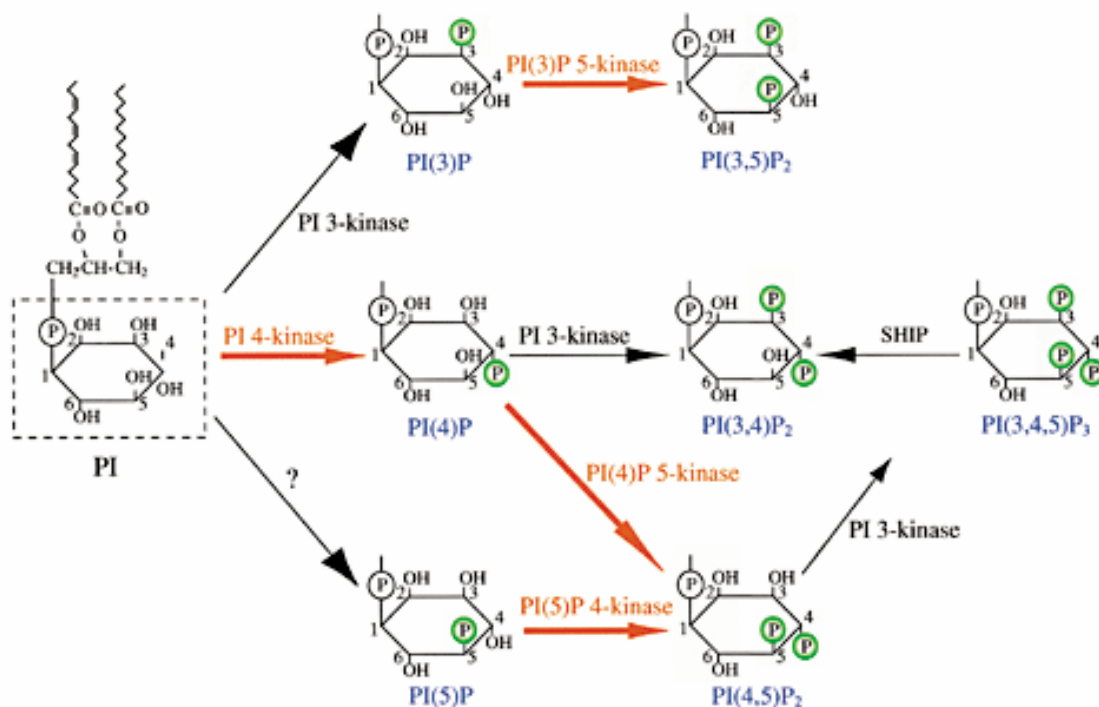


Figura 20. Fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados. El lípido fosfatidilinositol se puede fosforilar en los distintos fosfatos del anillo de inositol dando lugar a siete especies de fosfatidilinositoles diferentes. Esquema modificado de Kanaho y Suzuki, 2002.

PI(3)P es otro fosfoinosítido abundante en las células (0,2% del total de PIPs), mientras que otros como PI(3,5)P₂ (0,005%) o PI(3,4,5)P₃ (casi indetectable) aparecen en menor proporción (Lemmon y Ferguson, 2000; Duex y col., 2006). A pesar de no ser muy abundante todos estos

fosfoinosítidos presentan diferentes actividades biológicas normalmente mediadas por proteínas que reconocen su cabeza polar (Czech, 2002; Lemmon, 2008).

5.2. Localización, metabolismo y función de los fosfoinosítidos

La distribución espacial de los fosfoinosítidos viene determinada principalmente por la acción concertada de quinasas y fosfatasas. Por ejemplo, PI(4,5)P₂ y PI(3,4,5)P₃ están principalmente en la membrana plasmática, donde controlan la generación de mensajeros secundarios, exocitosis, endocitosis, y la reorganización del citoesqueleto de actina (Figura 21) (Odorizzi y col., 2000; di Paolo y de Camilli, 2006). Por contra, PI(3)P se localiza principalmente en endosomas y cuerpos multivesiculares (Figura 21), PI(4)P es abundante en el aparato de Golgi, y PI(3,5)P₂ se localiza en endosomas y lisosomas (D'Angelo y col., 2008) (Figura 21). Además, la presencia de PIPs en el núcleo sugiere que estos también regulan la dinámica de actina nuclear (Irvine, 2003). En el aparato de Golgi, PI(4)P actúa como co-receptor con Arf1 reclutando proteínas citosólicas en la red *trans*, y la quinasa que lo metaboliza PIP5K, es activada por Arf1. Además, la localización de PI(4)P en el aparato de Golgi también está regulada por fosfatasas como Sac1.

La interacción de PI(4,5)P₂ (de ahora en adelante PIP₂) con proteínas de unión a actina (ABPs) en endomembranas puede provocar la formación de microdominios ricos en PIP₂ (balsas lipídicas). Estos microdominios pueden resultar necesarios para la unión de complejos multimoleculares que controlan diversos procesos celulares.

Las quinasas de PIPs se expresan de forma ubicua y son muy abundantes en todas las membranas celulares, aunque muestran una gran especificidad por sus sustratos. Estas quinasas pueden dividirse en tres categorías: fosfoinosítido 3-quinasa (PI3Ks), fosfoinosítido 4-quinasa (PI4Ks) y fosfoinosítido 5-quinasa (PI5Ks). PIP₂ se genera por (PI4PK tipo 1) PIPK-I, localizadas en la membrana plasmática, o (PI4PK tipo 2) PIPK-II, localizadas en endomembranas, que utilizan a PI(4)P y PI(5)P como sustrato, respectivamente. PI3Ks son enzimas transductoras de señales intracelulares y controlan funciones celulares esenciales como la dinámica del citoesqueleto y el tráfico de membranas (Lindmo y Stenmark, 2006; Hirsch y col., 2009). Las PI3Ks convierten el PI(4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ (PIP₃), un segundo mensajero que se une a dominios PH, FYVE, PX, C1, C2 y otros dominios de unión a lípidos en proteínas efectoras para reclutarlos a la membrana plasmática. En condiciones normales las células muestran niveles bajos de PIP₃ y estos incrementan por la estimulación de factores de crecimiento. Existen dos fosfatasas que pueden defosforilar PIP₃: 1) PTEN que inhibe su señalización, y 2) las 5-fosfatasas que generan PIP₂ y puede prolongar la señalización

5.3.1. Los PIPs y los procesos celulares dependientes de actina

Tráfico vesicular

La endocitosis es un proceso celular fundamental responsable de la captación de nutrientes, regulación de rutas de señalización y procesos morfológicos. Existen 11 tipos diferentes de rutas endocíticas, incluyendo las dependientes de clatrina, caveolina, Arf6, macropinocitosis y fagocitosis.

En la vía endocítica de clatrina dependiente el proceso de reconocimiento de la carga va seguido de una reclutación de clatrina. Este último está mediado por el adaptador AP180 que se une a PIP_2 por su dominio ANTH. Posteriormente, la formación de invaginaciones de membrana está realizada por proteínas deformadoras de membrana, como epsina, que además de unirse a PIP_2 introducen una hélice anfipática en la membrana (Ford y col., 2002). Más adelante, los factores endocíticos se disocian rápidamente de la vesícula, en parte gracias a la defosforilación de PIP_2 , provocada por inositol 5-fosfatas que interactúan con dinamina en las últimas fases de la endocitosis (Cremona y col., 1999; McPherson y col., 1996).

En la fagocitosis, PIP_2 se acumula en los fagosomas tempranos por activación local de PIPK-I y juega un papel importante en la remodelación de actina a través del reclutamiento de ABPs en las membranas de los fagosomas (Coppolino y col., 2002). Después del inicio de la formación del fagosoma, la hidrólisis de PIP_2 y el desensamblaje de actina muestran cinéticas espaciales y temporales similares, y lo que es más importante, la desunión de actina del fagosoma se inhibe por la alteración de la hidrólisis de PIP_2 . Los receptores fagocíticos son capaces de activar PI3K, que transforma PIP_2 a PIP_3 . La acumulación de PIP_3 activa la miosinas que se localizan en los fagosomas ya que se unen al PIP_3 mediante su dominio PH (Cox y col., 2002).

PIP_2 está implicado también en la fase de pre-fusión de la exocitosis. Se ha observado que la distribución de PIP_2 coincide con la de las vesículas listas para ser liberadas, las competentes para llevar a cabo la exocitosis (Milosevic y col., 2005; di Paolo y col., 2004).

En estos procesos, PIP_2 tiene un papel fundamental como co-receptor de reclutamiento y regulación de proteínas endocíticas.

Quimiotaxis

La migración celular dependiente de lamelipodios se produce por extensión de protrusiones ricas en actina en el frente migratorio. Los PIPs tienen un papel fundamental en estas estructuras induciendo el ensamblaje de la actina en la membrana plasmática y orientando la dirección celular en la quimiotaxis. Se ha observado que PIP_3 se acumula en el frente migratorio en donde induce reorganizaciones en el citoesqueleto de actina. Esta producción de

PIP₃ es promovida por la activación de PI3K por receptores quimioatrayentes (Van Haastert y Veltman, 2007) (Figura 22). Además, en la cola migratoria, PTEN hidroliza PIP₃ suprimiendo la formación pseudópodos laterales y manteniendo una correcta dirección migratoria (Figura 22A). Estos gradientes de PIP₃ inducen el ensamblaje de filamentos de actina a través de la activación de RhoGTPasas. Contrariamente, PIP₂ inactiva las proteínas que promueven la polimerización y ensamblaje de los filamentos de actina, a excepción de las proteínas WASP.

Polaridad Celular

Para una correcta polarización es crucial una localización de PIP₂ y PIP₃ en diferentes compartimentos celulares (Gassama-Diagne y col., 2006). PIP₂ se encuentra en el dominio apical, donde reclutan anexina-2 que forma redes de actina cortical (Figura 22B), mientras que PIP₃ está restringida en la zona basolateral (Figura 22B) gracias a PKC-λ (Takahawa y col., 2008).

Citoquinesis

Durante la citoquinesis tanto PIP₂ como PIP₃ juegan un papel crucial. La formación o hidrólisis de ambos está ligado a variaciones temporales y espaciales de las actividades de PI3K y de PTEN. Cuando la célula empieza a redondearse, PIP₃ es indetectable debido a un incremento de actividad PTEN; durante la elongación PI3K produce PIP₃ en los polos (Figura 22C) promoviendo la polimerización de actina (Janetopoulos y Deverotes, 2006).

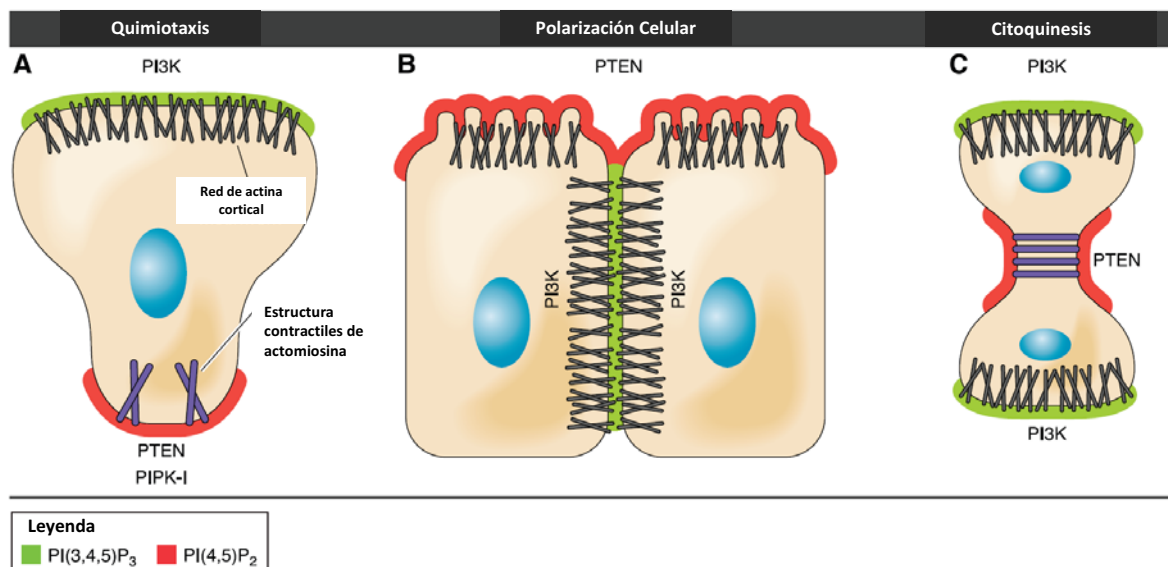


Figura 22. Distribución espacial de los PIPs durante los procesos de quimiotaxis, polarización y citoquinesis. En los diferentes procesos celulares los PIPs se distribuyen en unas zonas u otras permitiendo la señalización necesaria en esas regiones de la membrana. Figura modificada de Saarikangas y col., 2010.

PIP₂ juega un papel regulador en la citoquinesis localizándose en la zona de constricción (Figura 22C), controlando probablemente la actividad de varias ABPs.

5.3.2 Los PIPs y la regulación del citoesqueleto de actina

Muchas ABPs interaccionan directamente con los PIPs. Normalmente, la unión de proteínas a PIPs implica interacciones electrostáticas con cargas negativas de los fosfatos presentes en el anillo de inositol.

PIP₂ es el fosfoinosítido que más se ha relacionado con la regulación del citoesqueleto de actina (Sechi y Wehland, 2000). Interacciona directamente y regula ABPs promoviendo la formación de estructuras de actina debajo de la membrana plasmática y otros orgánulos intracelulares. La acumulación de PIP₂ induce el ensamblaje de la actina (Rozelle y col., 2000), mientras que su ausencia de PIPs indica deficiencias en la actina cortical (Raucher y col., 2000). Existen ciertos dominios proteicos que describen una elevada especificidad de unión a PIPs, que se encuentran en proteínas señalizadoras y proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina. Estos permiten regular la dirección de proteínas reguladoras y de andamiaje a los lugares de acción (Lemmon, 2008). Estos dominios son los siguientes: Dominios PH (presente en proteínas quinasas, GAPs, GEFs y proteínas transportadoras de lípidos; Cozier y col., 2004), Dominios PTB, Dominio PX y Dominio FYVE. Además, los PIPs también pueden unirse a ABPs que no presenten dominios canónicos de unión a PIPs. Algunos ejemplos de estas proteínas son: ADF/cofilina, Profilina, Twinfilina, Gelsolina, Vilina, α -actinina, Vinculina, Talina, ERM y Espectrina

5.3.3 Los PIPs y la regulación de las GTPasas

Muchas de las moléculas implicadas en la activación/desactivación de las GTPasas contienen dominios de unión a PIPs, tales como PH o FYVE. Los PIPs regulan la reclutación de GAPs a las membranas y consecuentemente su actividad ya que presentan dominios de unión a PIPs (Figura 23A). Por otro lado, diversas enzimas metabolizadoras de PIPs son efectores de las GTPasas, provocando una retroalimentación positiva o negativa de sistema (Figura 23B). Por último, las GTPasas unidas a membrana funcionan como co-receptores con los PIPs en el transporte de proteínas citosólicas a compartimentos intracelulares (Figura 23C) (di Paolo y de Camilli, 2006).

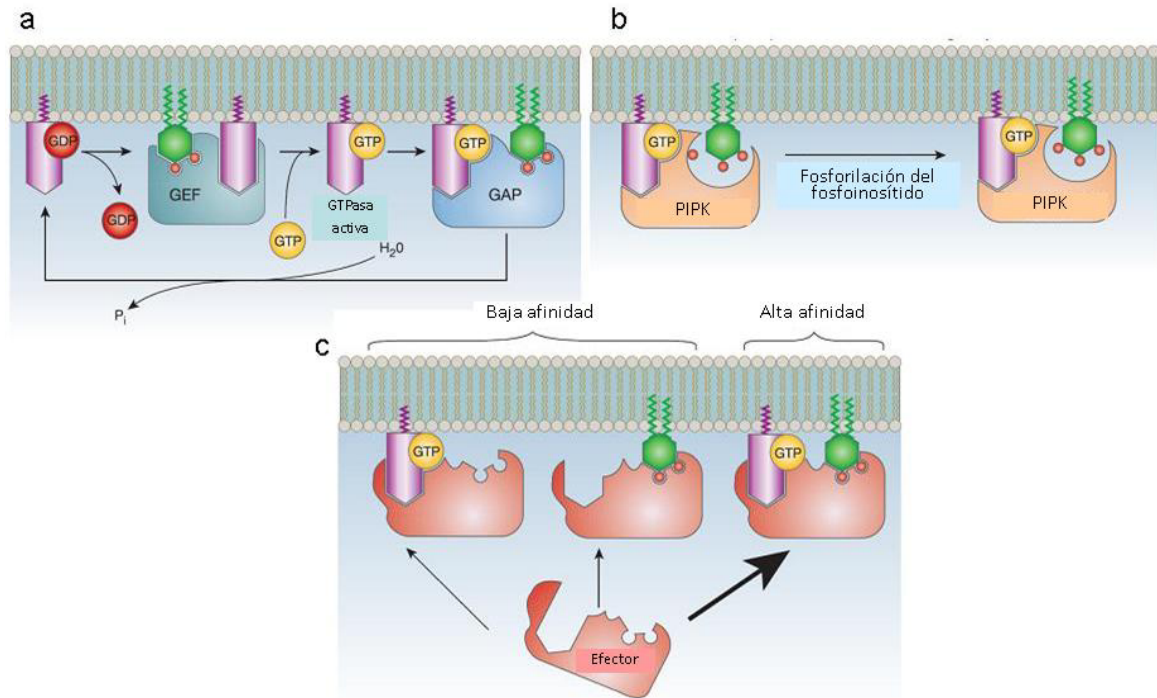


Figura 23. Interacción de los PIPs con las GTPasas. Los PIPs permiten el anclaje de proteínas reguladoras de las RhoGTPasas, ejercen de reguladoras de PIPs, y de co-receptores junto a las RhoGTPasas, de moléculas efectoras. Figura modificada de di Paolo y de Camilli, 2006.

De todas las RhoGTPasas, las que están más implicadas en la regulación de la dinámica y organización del citoesqueleto de actina son las familias Rho y Arf.

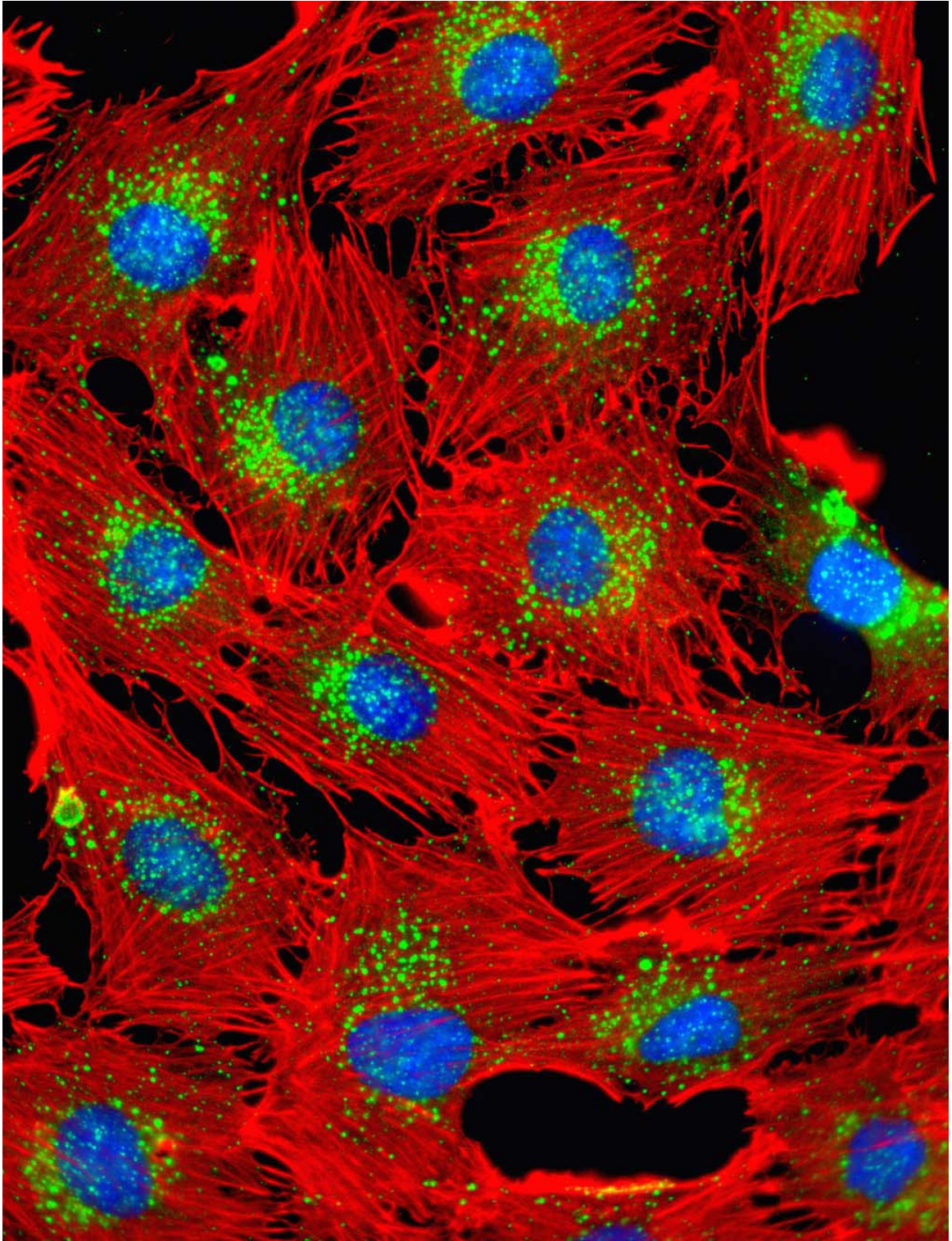
RhoGTPasas

Muchas RhoGAPs y RhoGEFs contienen dominios PH, y por ello sus actividades y/o localización subcelular están reguladas por PIPs (Saarikangas y col., 2010). Además, RhoA-GTP puede estimular la actividad PIPK-I a través de ROCK, controlando la síntesis de PIP_2 (Amano y col., 1997). La actividad de otra RhoGTPasa, Rac, está regulada por PIPs, e incluso Rac puede interaccionar directamente con PIPK-I y promover la síntesis de PIP_2 en la membrana plasmática (Chatah y Abrams, 2001). En cuanto a Cdc42, una de sus GEFs, fabrina, contiene dominios PH y FYVE, lo cual conecta su actividad y localización a la señalización de PIPs (Nakanishi y Takai, 2008).

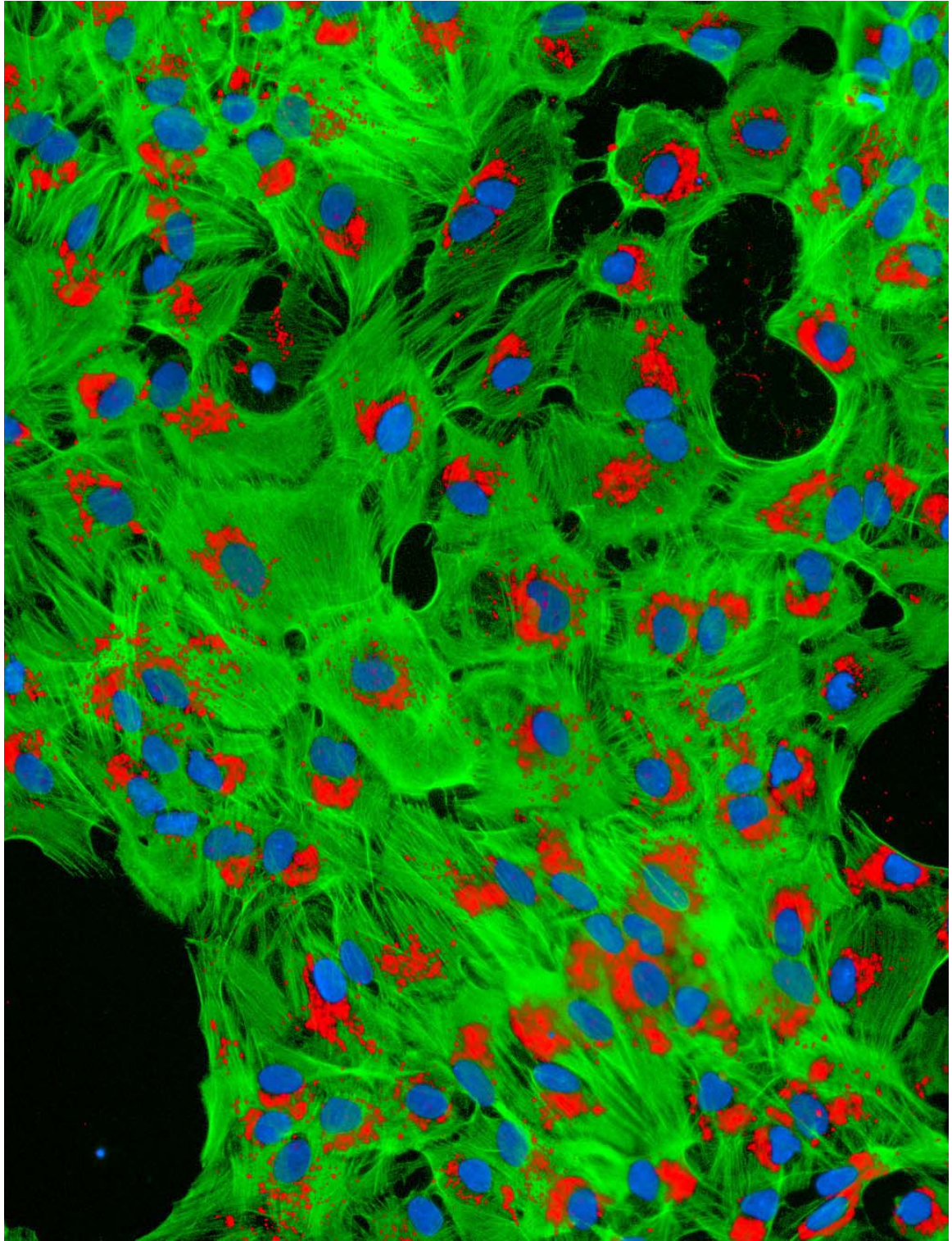
ArfGTPasas

Estas proteínas juegan un papel muy importante en las rutas de tráfico y su actividad está estrechamente conectada al citoesqueleto de actina. La mayoría se localizan en el aparato de Golgi (Arf1), menos Arf6 que principalmente se encuentra en la membrana plasmática y

endosomas. Estas GTPasas están implicadas en reorganizaciones del citoesqueleto de actina mediante la inducción de producción de PIP_2 tanto en la membrana plasmática como en el aparato de Golgi. Arf6 altera la composición lipídica de la membrana plasmática activando PIPK-I a través de una interacción directa (Aikawa y Martin, 2003). Las ArfGTPasas también se unen a PLD, que procesa fosfatidilcolina (PC) generando ácido fosfatídico (PA). PA, estimula la actividad de quinasas PIPK-I de forma sinérgica con Arf, aumentando la producción de PIP_2 .



II. - OBJETIVOS



III. - RESULTADOS

PRIMER TRABAJO: “Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol.”

Journal of Neurochemistry
(2007; 102: 1044-1052)

OBJETIVO 1. - Elucidar las vías de señalización a través de las cuales la exposición crónica a etanol afecta la organización del citoesqueleto de actina.

Anteriormente se había descrito que la exposición crónica a etanol provocaba, entre otras, alteraciones en la vía endocítica (Tomás y col., 2002). Ello coincidía con alteraciones en la dinámica y la organización del citoesqueleto de actina, las cuales según ciertas evidencias experimentales (comentadas en la discusión) podían ser causadas por la RhoGTPasa RhoA (Tomás y col., 2003). Conceptualmente, este primer trabajo trataba de profundizar en los mecanismos moleculares por los cuales la exposición crónica a etanol provocaba tales modificaciones en la actina. Para ello se analizaron moléculas implicadas en la regulación de la organización y dinámica del citoesqueleto de actina, las RhoGTPasas RhoA, Rac1 y Cdc42 así como los niveles de los fosfoinosítidos. Se observó una disminución de niveles de RhoA activa (RhoA-GTP) en astrocitos expuestos a etanol, lo cual venía dado por el aumento de la actividad RhoGAP. Otras RhoGTPasas, como Cdc42 o Rac no presentaban alteraciones. Por otro lado, el etanol disminuía los niveles de fosfatidilinositol [PI], fosfatidilinositol monofosfato [PI(4)P] y fosfatidilinositol bifosfato [PI(4,5)P₂]. El ácido lisofosfatídico (LPA), un conocido estimulador de la vía RhoA, restituía la organización normal del citoesqueleto de actina en astrocitos expuestos al etanol y normalizaba los niveles de RhoA-GTP y de fosfoinosítidos. Por ello, se concluye que el etanol afecta a moléculas implicadas en la regulación de la actividad de RhoA, concretamente las proteínas RhoGAP, y que el LPA actúa como un agente citoprotector frente al alcohol.

Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol

Susana E. Martínez,* Francisco Lázaro-Diéguez,*† Javier Selva,*† Fernando Calvo,‡ Jaime-Renau Piqueras,§ Piero Crespo,‡ Enrique Claro¶ and Gustavo Egea*†

*Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

†Institut de Nanociències i Nanotecnologia (IN²UB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

‡Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC-Universidad de Cantabria, Santander, Spain

§Centro de Investigación, Hospital Universitario La Fe, Valencia, Spain

¶Institut de Neurociències and Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona, Spain

Abstract

Long-term ethanol treatment substantially impairs glycosylation and membrane trafficking in primary cultures of rat astrocytes. Our previous studies indicated that these effects were attributable to a primary alteration in the dynamics and organization of the actin cytoskeleton, although the molecular mechanism(s) remains to be elucidated. As small Rho GTPases and phosphoinositides are involved in the actin cytoskeleton organization, we now explore the effects of chronic ethanol treatment on these pathways. We show that chronic ethanol treatment of rat astrocytes specifically reduced endogenous levels of active RhoA as a result of the increase of in the RhoGAP activity. Furthermore, ethanol-treated

astrocytes showed reduced phosphoinositides levels. When lysophosphatidic acid was added to ethanol-treated astrocytes, it rapidly reverted actin cytoskeleton reorganization and raised active RhoA levels and phosphoinositides content to those observed in untreated astrocytes. Overall, our results indicate that the harmful effects of chronic exposure to ethanol on a variety of actin dynamics-associated cellular events are primarily because of alterations of activated RhoA and phosphoinositides pools.

Keywords: actin cytoskeleton, astrocytes, ethanol, fetal alcohol syndrome, lysophosphatidic acid, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, RhoA.

J. Neurochem. (2007) **102**, 1044–1052.

Chronic alcohol (ethanol) consumed during pregnancy causes a wide spectrum of physical and mental alterations in the offspring, which can lead to the appearance of the fetal alcohol syndrome. Fetal alcohol syndrome is characterized by pre- and/or post-natal growth deficiencies, microcephaly, characteristic facial anomalies and mental retardation in neonates (Floyd *et al.* 2005; Krulwich 2005; Martínez and Egea 2007 for recent reviews). The alteration of essential cellular processes has been proposed to explain the teratogenicity of ethanol (Martínez and Egea 2007). One of them is that it perturbs the genesis, proliferation and survival of astrocytes (Guerri *et al.* 2001; Costa *et al.* 2004; Vemuri and Chetty 2005). In this respect, we have previously reported that ethanol alters both actin cytoskeleton organization and microtubule dynamics in rat astrocytes (Tomás *et al.* 2003), which suggests subsequent alterations of those cellular

processes dependent on both cytoskeletons. Thus, we observed that in rat astrocytes ethanol impairs glucose uptake, and endocytic and secretory protein transport (Tomás

Received November 29, 2006; revised manuscript received February 20, 2007; accepted March 7, 2007.

Address correspondence and reprint requests to Gustavo Egea, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, C/ Casanova 143, E-08036 Barcelona, Spain. E-mail: gegea@ub.edu

Abbreviations used: FBS, fetal bovine serum; GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor; GST, glutathione-S-transferase; LPA, lysophosphatidic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PBD, PAK1 binding domain; PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PIP5K, phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase; PLD, phospholipase D; RBD, Rhoketin Rho binding domain.

et al. 2002, 2003), which in turn are associated with the state of actin cytoskeleton organization and dynamics (Lanzetti *et al.* 2001; Ridley 2006; Smythe and Ayscough 2006).

Lysophosphatidic acid (LPA) is a serum component that stimulates Rho signalling pathway, which governs actin cytoskeleton organization and stabilizes microtubules (Cook *et al.* 1998; Jaffe and Hall 2005). LPA mediates changes in cell shape by signalling through small G-proteins of the Rho family in several cell types (Ridley and Hall 1992; Jalink *et al.* 1994; Moolenaar *et al.* 2004) including astrocytes (Ramakers and Moolenaar 1998). We have previously reported that LPA rescues the alterations in monosaccharide uptake and actin cytoskeleton organization caused by ethanol in rat astrocytes (Tomás *et al.* 2003). The cytoprotective role of LPA could involve RhoA GTPase signalling, as the expression of a constitutively activated RhoA mutant (RhoA-V14) in both ethanol-treated astrocytes and NIH3T3 cells (Guasch *et al.* 2003; Tomás *et al.* 2003) renders cells resistant to ethanol-induced alterations in actin and monosaccharide uptake. Taking into account these results, we hypothesized a model to explain the respective effects of ethanol and LPA, in which we anticipated the involvement of the RhoA signalling pathway and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) in the ethanol-induced actin cytoskeleton alterations (Tomás *et al.* 2003). Here we demonstrate that ethanol indeed decreases the endogenous levels of active (GTP-bound) RhoA pool (without altering Rac1 or Cdc42) and phosphoinositides levels, particularly PIP₂. Strikingly, LPA treatment restores normal activated RhoA and phosphoinositides pools, thus providing a molecular mechanism for the cytoprotective role of LPA in front of ethanol exposure.

Material and methods

Plasmid construct and reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium, Medium 199, fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and glutamine were obtained from Gibco/Brl Life Technologies (Paisley, UK). LPA (oleoyl-L- α -lysophosphatidic acid sodium salt) and α -tubulin mouse monoclonal antibody were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Rodamine-phalloidin was from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Culture reagents were all from Invitrogen (Paisley, UK). Mouse monoclonal antibodies against Cdc42, Rac1 or RhoA and secondary peroxidase-conjugated antibodies were from BD Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). Myo-[2-³H]inositol (10–20 Ci/mmol) and [³²P]orthophosphate were from Amersham Biosciences, GE Healthcare (Barcelona, Spain).

Primary cultures of rat astrocytes and ethanol treatment

Primary cultures of cortical and cerebellum astrocytes were prepared from newborn (P1) Wistar rats as previously reported (Tomás *et al.* 2005). Briefly, cells were plated into 75 cm² flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium culture medium supplemented with 10% FBS. The cell cultures were incubated in a humidified atmosphere of

5% CO₂ at 37°C. The purity of astrocyte cultures was assessed by immunofluorescence using anti-gial fibrillary acidic protein monoclonal antibody (Renau-Piqueras *et al.* 1989), which showed that cell cultures contained 90–95% of astrocytes. Before confluence, cells were replated and grown for at least 7 days in the absence or presence of ethanol, which was added to the culture medium when the cells were replated. Ethanol was added every 24 h to maintain constant ethanol concentration in the medium. For LPA treatments, cells were cultured for 12 h with low-serum medium (0.5% FBS) and subsequently with serum-free medium for 2 h before adding LPA (0.5–1 μ mol/L). All experiments using rats were approved by the appropriate institutional review committee and performed in strict compliance with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Fluorescence microscopy

Cultured astrocytes were fixed in 4% (w/w) formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min at 20°C, washed in PBS (3 \times 5 min) and incubated in PBS containing 50 mmol/L ammonium chloride. Cells were then permeabilized for 10 min with PBS containing 0.1% saponin and 1% bovine serum albumin. Actin cytoskeleton was visualized by incubating cells for 30 min with 0.1 mg/mL of rodamine-labelled phalloidin. Stained cells were observed with a BX60 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) with an Orca-ER cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan). The images were processed using Adobe Photoshop CS software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Rho GTPases pull-down experiments and GTP-bound RhoA colorimetric assay

GTP-bound Cdc42, Rac1 and RhoA were determined using co-precipitation assays as previously described (Ren *et al.* 1999). GTP-Cdc42 and GTP-Rac1 interact with the PAK1 binding domain (PBD) fused to glutathione S-transferase (GST) bound to glutathione-coupled agarose beads. GTP-bound RhoA (but not GDP-bound Rho) specifically interacts with the Rho-kinase binding domain (RBD), which is coupled to glutathione-coupled agarose beads. Briefly, astrocytes were scraped and lysed on ice in 450 μ L lysis buffer, which for the GST-PBD pull-down experiments contained 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 0.5% NP40, 5 mmol/L β -glycerophosphate, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin; for the GST-RBD pull-down experiments the lysis buffer contained 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 200 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 1% NP40, 10% glycerol, 1 mmol/L sodium orthovanadate, 10 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL aprotinin. Subsequently, lysates were microfuged at 10 000 g for 10 min at 4°C and the respective supernatants were transferred to a fresh, chilled microfuge tube containing 20 μ g of either GST-PBD or GST-RBD sepharose beads. Affinity purifications were carried out at 4°C for 1 h, washed three times with 10 vol of lysis buffer, and then analysed by immunoblotting. Protein was measured in 25 μ L of each supernatant by the Lowry method.

Quantitative colorimetric assay utilizing and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based RhoA activity detection method (G-LISA; Cytoskeleton Technology, Denver, CO, USA) was performed to measure RhoA activity in cell extracts following the manufacturer's instructions. Briefly, cell extracts were lysed by the buffer provided in the kit and lysates were incubated in

microwells to which the RBD was bound. Active RhoA was detected using indirect immunodetection followed by a colorimetric reaction measured by absorbance at 490 nm.

RhoGAP/GEF activity assays

To determine RhoGAP activity, bacterially expressed RhoA was purified by standard procedures and loaded with γ -[32 P]-GTP. For the GTPase-activating protein (GAP) reaction, GTP-loaded RhoA was incubated with lysates in the presence of $MgCl_2$ (10 mmol/L) at 37°C for 60 min. The reaction mixture was subsequently fractionated in sodium molybdate/isopropyl acetate. A sample of the organic phase was counted by scintillation. In the case of RhoGEF activity determinations, the RhoGEF exchange assay biochem kit (Cytoskeleton) was used according to manufacturer's instructions.

Immunoblotting

Equal amounts of beads were subjected to 15% (v/v) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Immobilon-P; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Blots were blocked in 5% non-fat dry milk/TBST buffer (20 mmol Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20) and immunoblotted for Rac1, Cdc42 and RhoA. Cdc42 and Rac1 were detected using either mouse anti-Cdc42 or anti-Rac1 primary antibodies (1 : 1000) with an overnight incubation at 4°C. RhoA was detected by using mouse anti-RhoA monoclonal primary antibody (1 : 500) with an overnight incubation at 4°C. α -tubulin was used as a loading control. Blots were then labelled with anti-mouse IgG HRP or anti-rabbit IgG HRP at 20°C and incubated with enhanced chemiluminescence detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) according to the supplier's instructions. Bands were visualized by exposure of the membrane to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Quantification was performed by densitometric scanning of the film using a GS-700 Imaging Densitometer with Multi-Analyst 1.1 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Endogenous total GTPase levels in lysates used for affinity purification were normalized to endogenous α -tubulin levels.

Phosphoinositide content

Astrocytes were cultured in the low-inositol containing medium 199 and labelled for 3 days with 1 μ Ci/mL myo-[2- 3 H]-inositol] to approach isotopic equilibrium. After removing the medium, cells were washed twice in PBS and lipids were extracted with chloroform/methanol/concentrated HCl (100 : 200 : 1). Chloroformic lipid extracts (Bligh and Dyer 1959) were evaporated in a speed-vac concentrator. After addition of 20 μ g mixed phosphoinositides (Sigma) as carrier, samples were spotted on silica gel 60 TLC plates (Merck), which were developed using methanol/chloroform/ NH_4OH /water (48 : 40 : 5 : 10). Lipid bands were visualized with iodine vapor or with primuline spray. Silica gel areas corresponding to phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) and PIP₂ (Rf values were 0.63, 0.47 and 0.25, respectively), which were identified by co-migration with carrier alone, were scraped into vials and counted for radioactivity.

Statistical analysis

Statistical analysis of results was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple

comparison test (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results were expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Results

Ethanol decreases activated RhoA and phosphoinositide levels in astrocytes

Astrocytes were grown in the absence or in the presence of ethanol (30 and 100 mmol/L for 7 days). Untreated astrocytes (control) showed numerous well-organized actin stress fibers (Fig. 1a, panels i and ii), whereas a significant proportion (~50%) of cells treated with high ethanol concentration (100 mmol/L) showed a variety of altered actin cytoskeleton patterns (Fig. 1a, panels iii and v), which basically consisted in having either a lower density of actin stress fibers (Fig. 1a, panel iv) or the actin cytoskeleton rearranged in a circle beneath the plasma membrane (Fig. 1a, panel vi) (Guasch *et al.* 2003; Tomás *et al.* 2003). These alterations were milder in cells treated with 30 mmol/L ethanol (data not shown).

Next, untreated and ethanol-treated astrocytes were subjected to pull-down assays using GST-rhoketin to co-precipitate endogenous GTP-RhoA or GST-p21 activated kinase for endogenous GTP-Rac1 and GTP-Cdc42. Chronic ethanol treatments (30 and 100 mmol/L) significantly reduced endogenous levels of active RhoA (GTP-bound RhoA) in astrocytes isolated from the cortex (Fig. 1b, left panel; quantitative analysis shown in Fig. 1c). In contrast, ethanol had no effect on the levels of active Rac1 or Cdc42 (Fig. 1b). We also examined whether the ethanol-induced changes in activated RhoA pool were a consequence of an alteration in RhoA protein levels. As shown in Figs 1(d) and (e), ethanol did not affect the endogenous protein content of any Rho GTPase. To assess whether these ethanol-induced alterations on RhoGTPases are also produced in other brain regions, we tested astrocytes isolated from the cerebellum, which is one of the major areas affected by ethanol (Eckardt *et al.* 1998; West and Blake 2005). After ethanol exposure, cerebellar astrocytes also showed actin cytoskeleton alterations, which were similar to those observed in cortical astrocytes (data not shown). Notably, only ethanol at 100 mmol/L decreased the endogenous activated RhoA pool (Fig. 1b, right panel; quantitative analysis in Fig. 1c), but like in the case of cortical astrocytes without altering protein expression levels (Fig. 1d).

Rho GTPases cycle between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound form, whose activity is controlled by a large family of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and GAPs, and a few guanine nucleotide dissociation inhibitors (Jaffe and Hall 2005). Therefore, the ethanol-induced decrease of activated RhoA pool could be equally caused by an increase in RhoGAP or by a decrease in RhoGEF

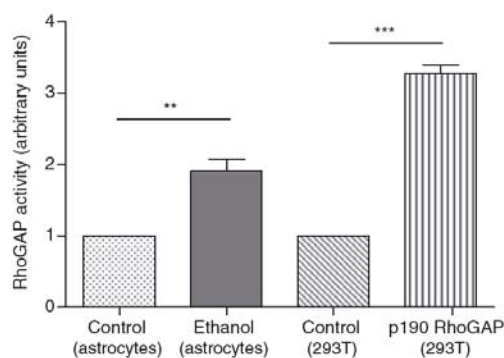


Fig. 2 Ethanol increases RhoGAP activity. Rat astrocytes were grown in the absence or presence of ethanol (100 mmol/L) for 7 days. Thereafter, GTPase-activating protein activity was assayed on GTP-loaded RhoA as described in Material and Methods. For an internal comparative reference, RhoGAP activity levels in parental and p190RhoGAP-transfected 293T cells are also shown. Results are the mean \pm SD obtained from five independent experiments.

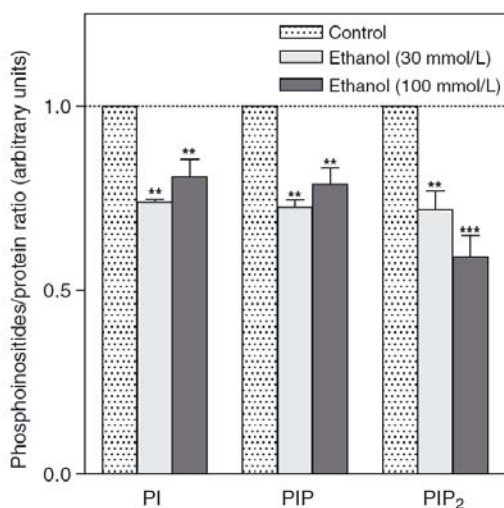


Fig. 3 Ethanol decreases the content of phosphoinositides. Rat astrocytes were grown for 5 days in the absence or presence of ethanol (30 or 100 mmol/L). Then, cultures were labelled with myo-[³H]inositol for 48 h. At the end of the treatment, cellular levels of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) were determined and normalized for protein content. Bars show the mean \pm SD obtained from four independent experiments. Statistical significance ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

(Fig. 4d) (Tomás *et al.* 2003). As LPA activates Rho-dependent signalling (Ridley and Hall 1992; Kranenburg *et al.* 1999; Ren *et al.* 1999) and ethanol decreases endo-

genous RhoA activation (Fig. 1), we then examined whether LPA restored the endogenous levels of activated RhoA in ethanol-treated astrocytes. To this end, cortical and cerebellar astrocytes were treated with ethanol (100 mmol/L for 7 days) and LPA (1 μ mol/L for 90 min at the end of the ethanol exposure). Cell lysates were subsequently subjected to pull-down experiments (Fig. 4a). As previously indicated (Fig. 1b), ethanol induced the decrease of activated RhoA, but not in cells that were submitted to LPA treatment (Figs 4a and b). This was also confirmed using the colorimetric G-LISA assay, which measures endogenous Rho activation levels (Fig. 4c). RhoA protein levels also remained unaltered (Fig. 4c, upper panel).

Next, we examined whether the phosphoinositide pool decreased by ethanol (Fig. 5) is restored by LPA treatment. When LPA was added to ethanol-treated astrocytes as previously indicated, all three phosphoinositides examined recovered normal values (Fig. 5a). No differences in total phosphoinositide labelling were observed in untreated and ethanol-treated cells (data not shown). To confirm the reversion induced by LPA on PIP₂ content in ethanol-treated astrocytes, PIP₂ levels were also measured using another experimental approach. Thus, cortical astrocytes were incubated with FBS and ethanol (100 mmol/L) for 5 days and then transferred to a low-serum medium containing [³²P] orthophosphate and ethanol for a further 3 days. Ethanol and LPA were added to the medium every 24 h. As shown in Fig. 5b, ethanol indeed diminished endogenous PIP₂ levels, but not in cells treated with LPA. Therefore, data show that ethanol reduces phosphoinositides levels in rat astrocytes and LPA is able to restore them to normal values.

Discussion

In the present study, in an attempt to examine the molecular mechanism by which ethanol alters actin cytoskeleton organization and dynamics, we examined the effects of moderate (30 mmol/L) and high (100 mmol/L) ethanol concentrations on the role of basic Rho GTPase family members (RhoA, Rac1 and Cdc42) as potential primary targets of ethanol. Notice that the ethanol concentrations used are comparable to blood alcohol concentrations observed in ethanol-tolerant individuals (up to \sim 120 mmol/L) and pregnant women (up to \sim 80 mmol/L) (Urso *et al.* 1981; Church and Gerkin 1988; Jones and Sternebring 1992; Eckardt *et al.* 1998). Consequently, it is reasonable that fetuses of mothers who drink could be exposed to similar ethanol concentrations used in our study.

We have observed that ethanol diminishes the endogenous pool of active RhoA in primary cultures of rat astrocytes isolated from cortex and cerebellum, which are areas especially susceptible to ethanol effects during development (Eckardt *et al.* 1998; Cudd 2005). In contrast, neither Rac1 nor Cdc42 was impaired by ethanol, which validates our

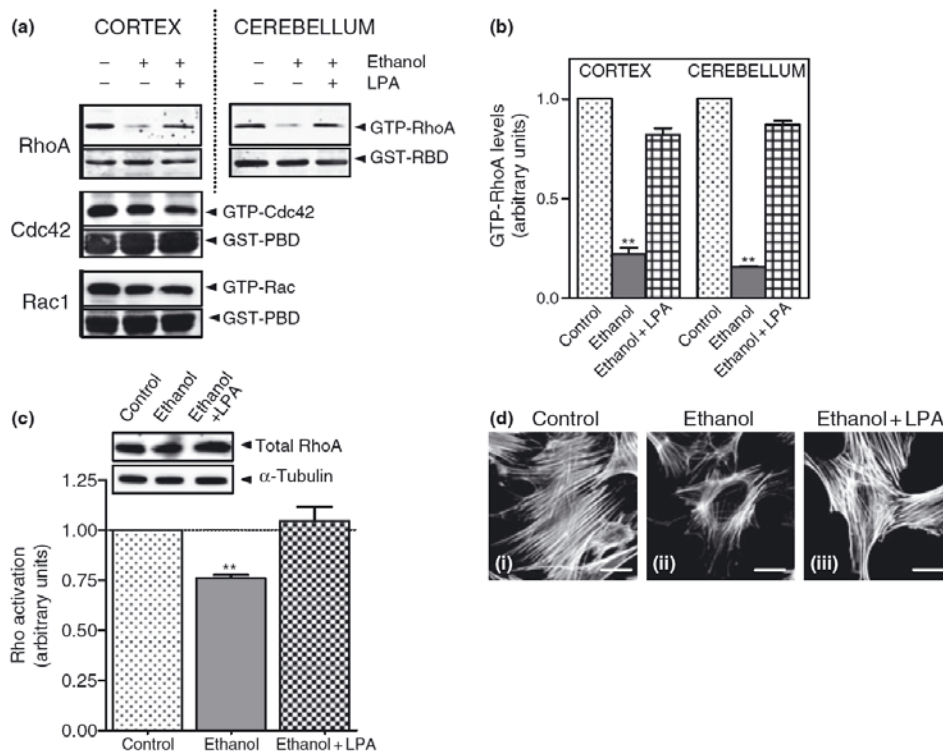


Fig. 4 Lysophosphatidic acid (LPA) normalizes the GTP-bound RhoA pool in ethanol-treated astrocytes. (a) GTP-bound RhoA, Cdc42 and Rac1 pools were detected by immunoblotting of pull-down experiments from untreated and ethanol (100 mmol/L)-treated cell lysates incubated with or without LPA (1 μ mol/L). Lower row of each RhoGTPase shows glutathione-S-transferase-Rhodokin Rho binding domain (GST-RBD) or GST-PAK1 binding domain (PBD) on glutathione beads stained with coomassie blue and used as loading control. (b) Quantitative analysis of pull-down experiments shown in panel a. (c) Cortical astrocytes grown in absence or presence of ethanol (100 mmol/L) were assayed for endogenous Rho activity using

G-LISA™ (see Material and Methods). LPA (1 μ mol/L) was added to ethanol-treated astrocytes 90 min before Rho activity measurement. Results are the mean \pm SD from four different experiments. Statistical significance ** $p \leq 0.01$. The upper small panel shows a representative RhoA immunoblot from lysates of control and ethanol-treated astrocytes incubated in the absence or presence of LPA (1 μ mol/L). α -Tubulin was used as the loading control. (d) Representative control (i) and astrocytes treated with (ii) ethanol (100 mmol/L) or (iii) ethanol (100 mmol/L) plus LPA (1 μ mol/L) were all stained with rhodamine-conjugated phalloidin to visualize actin cytoskeleton organization. Bars: 10 μ m.

hypothesis that RhoA is the major small Rho GTPase directly targeted by ethanol in rat astrocytes (Tomás *et al.* 2003). Other recent reports have shown that ethanol impairs Rho GTPase signalling in different cell types (Slater *et al.* 2003; Joshi *et al.* 2006; Schaffert *et al.* 2006) and that this impairment seems to be related to actin cytoskeleton reorganization (Offenhauser *et al.* 2006). Importantly, our results indicate that the total content of RhoA remains unchanged, which suggests that the ethanol-induced decrease of active RhoA is because of a shifting in GTP/GDP-bound RhoA equilibrium rather than to a previously reported down-regulation of RhoA protein levels (Guasch *et al.* 2003). The Rho GTPase cycle is regulated by GEFs, which exchange GDP for GTP and consequently promote the GTP-bound

active form of Rho-GTPase, and by GAPs, which stimulate GTP hydrolysis and return Rho proteins to an inactive GDP-bound state (Jaffe and Hall 2005). Here, we observe that the ethanol-induced decrease in the GTP-bound RhoA pool results from a high increase in the RhoGAP activity and not from a decrease in RhoGEF activity. In this regard, changes in RhoGAP18B activity have been recently associated with ethanol sensitivity in *Drosophila* (Rothenfluh *et al.* 2006).

We reported that LPA reverts actin cytoskeleton alterations in ethanol-treated astrocytes (Tomás *et al.* 2003 and Fig. 4d) and that NIH3T3 cells constitutively expressing activated RhoA mutant are resistant to the ethanol-induced alterations in actin (Tomás *et al.* 2003). LPA activates the RhoA signalling pathway (Kranenburg *et al.* 1999) and induces

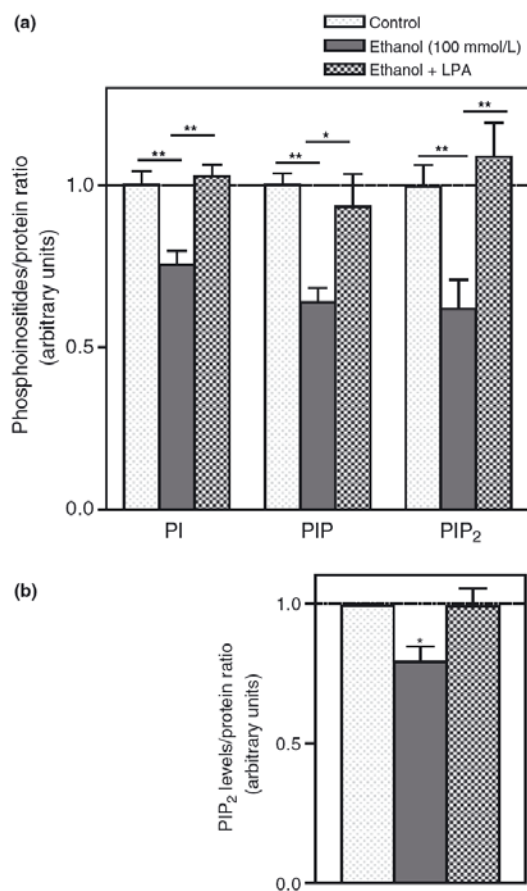


Fig. 5 Lysophosphatidic acid (LPA) normalizes phosphoinositides content in ethanol-treated astrocytes. (a) Astrocytes were grown for 4 days and then labelled with myo-³Hinositol for a further 3 days both in the absence and in the presence of ethanol (100 mmol/L). Control and ethanol-treated cells were cultured in the presence of serum for 6 days except the last 24 h for the subsequent treatment with LPA (1 μmol/L), which was added 90 min before the total lipid extraction. Cellular levels of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP) and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) were normalized for protein content. (b) Control and ethanol-treated astrocytes were grown for 5 days and then labelled with [³²P]orthophosphate for 2 days more. LPA treatment was performed as indicated above. PIP₂ levels were normalized for protein content. Results are the mean ± SD obtained from four independent experiments. Statistical significance **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

RhoA-mediated stress-fiber formation (Ridley and Hall 1992; Ren *et al.* 1999). Here we have extended this observation by examining the effect of LPA on the endogenous GTP-bound RhoA pool in cortical and cerebellar astrocytes exposed to ethanol, and indeed LPA normalizes endogenous GTP-RhoA levels in ethanol-exposed astrocytes.

RhoA is key player in the actin stress fibers formation (Ridley and Hall 1992). Among the effectors of RhoA involved, the serine/threonine kinase ROCK regulates myosin light chain phosphorylation, which promotes the actin filament cross-linking activity of myosin II (Riento and Ridley 2003). However, stress fiber formation in response to RhoA also involves other effectors such as phosphoinositides (Sahai *et al.* 1998; Yamamoto *et al.* 2001; Yoneda *et al.* 2005). Here, we report that ethanol decreases the content of PI, PIP and PIP₂. Phosphoinositides and their derivatives, despite their relatively low abundance, are essential regulators of actin dynamics and organization, which are fundamental in numerous cell processes such as membrane trafficking, cell motility and invasiveness (Yin and Janmey 2003; Lindmo and Stenmark 2006). Thus, PIP and PIP₂ regulate cytoskeletal rearrangement through their association with a variety of actin-binding proteins (Lassing and Lindberg 1985; Yonezawa *et al.* 1990; Yin and Janmey 2003). Increased formation of PIP₂ by over-expression of phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase (PIP5K) also results in actin cytoskeleton reorganization (Shibasaki *et al.* 1997), whereas exposure to PIP₂ phosphatase or microinjection of PIP₂ antibodies resulted in actin cytoskeleton disruption, decreased cell adhesion and the consequent cell rounding (Gilmore and Burridge 1996; Sakisaka *et al.* 1997; Raucher *et al.* 2000). Thus, the decrease of phosphoinositides caused by ethanol could also explain the variety of actin cytoskeleton rearrangements seen in ethanol-treated astrocytes, which in addition may also be induced and even exacerbated by the fall in GTP-bound RhoA levels (Fig. 6). Ethanol could also decrease phosphoinositides content by its inhibitory action on phospholipase D (PLD) leading to a reduction of phosphatidic acid (Klein 2005), whose decrease could in turn diminish the synthesis of PI catalysed by CDP-diacylglycerol synthase and PI synthase (Heacock and Agranoff 1997; Lykidis *et al.* 1997) (Fig. 6). As the sequential phosphorylation of PI through phosphatidylinositol 4-kinase and PIP5K is a major route of PIP and PIP₂ generation, the induced decrease in PI levels should finally lead to lower levels of PIP and PIP₂, which is what we observe in ethanol-treated astrocytes. At the same time, phosphatidic acid is likewise a direct activator of PIP5K (Jones *et al.* 2000; Skippen *et al.* 2002). On the other hand, RhoA is a binding activator of PLD activity (Exton 2002; Klein 2005). Thus, the putative involvement of the RhoA/PLD functional interaction must be taken into account to explain the decrease in all three phosphoinositides in ethanol-treated astrocyte (Fig. 6). The finding that LPA treatment restored their normal levels favors the hypothesis of the RhoA-dependent PLD stimulation. In fact, several studies have shown such effective stimulation in fibroblasts, prostate cancer cells and neutrophils (Tou and Gill 2005). Finally, there is also strong interaction between phosphoinositide kinases and the RhoA-dependent pathway. Thus, RhoA stimulates PIP5K activity, which implies a direct

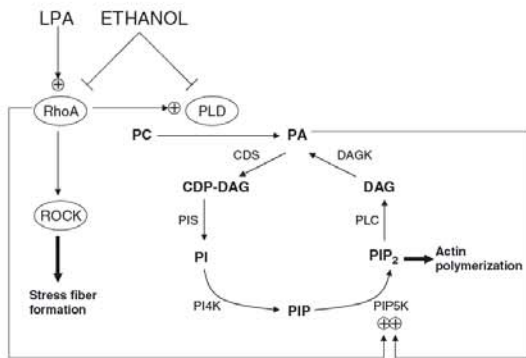


Fig. 6. Model by which lysophosphatidic acid (LPA) could re-establish the normal actin cytoskeleton organization and phosphoinositides content in rat astrocytes chronically exposed to ethanol. See the text (Discussion) for details. CDP-DAG, CDP-diacylglycerol; CDS, CDP-DAG synthase; DAG, diacylglycerol; DGK, DAG kinase; PA, phosphatidic acid; PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP₂, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PI4K, phosphatidylinositol-4-kinase; PIP5K, phosphatidylinositol-4-phosphate-5-kinase; PIS, phosphatidylinositol synthase; PLC, phospholipase C; PLD, phospholipase D; ROCK, Rho-dependent protein kinase.

RhoA-controlled synthesis of PIP₂ (Oude Weemink *et al.* 2000, 2004).

How do we explain the cytoprotective effect of LPA in ethanol-exposed astrocytes? At the same time that LPA activates RhoA-Rho kinase pathway and, consequently, directly stimulates the actin stress fiber formation (Fig. 6), it could also rescue normal PIP₂ levels by stimulating PIP5K through the restitution of the normal GTP-bound RhoA pool. Consequently, this RhoA-induced stimulation of PIP₂ would also produce net actin polymerization in ethanol-treated astrocytes. The re-establishment of activated RhoA and phosphoinositide contents by LPA reported here is consistent with this postulate.

In conclusion, we demonstrate that ethanol reduces endogenous activated RhoA (because of an increase in RhoGAP activity) and phosphoinositides levels in primary cultures of rat astrocytes. These results provide an explanation of the molecular mechanisms involved in the impairments caused by ethanol on the actin cytoskeleton organization. Notably, LPA treatment restored both active RhoA and phosphoinositides pools, which supports the hypothesis that it protects cells from the harmful effects of ethanol.

Acknowledgements

We thank Maite Muñoz for technical support and Robin Rycroft for editorial assistance. This study was partially supported by grants to GE (BFU2006-897 and Consolider CSD2006-00012) and to EC (SAF2004-01698).

References

- Bligh E. G. and Dyer W. J. (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917.
- Church M. W. and Gerkin K. P. (1988) Hearing disorders in children with fetal alcohol syndrome: findings from case reports. *Pediatrics* **82**, 147–154.
- Cook T. A., Nagasaki T. and Gundersen G. G. (1998) Rho guanine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J. Cell Biol.* **141**, 175–185.
- Costa L. G., Vitalone A. and Guizzetti M. (2004) Signal transduction mechanisms involved in the antiproliferative effects of ethanol in glial cells. *Toxicol. Lett.* **149**, 67–73.
- Cudd T. A. (2005) Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp. Biol. Med.* **230**, 389–393.
- Eckardt M. J., File S. E., Gessa G. L. *et al.* (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 998–1040.
- Exton J. H. (2002) Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* **531**, 58–61.
- Floyd R. L., O'Connor M. J., Sokol R. J., Bertrand J. and Codero J. F. (2005) Recognition and prevention of fetal alcohol syndrome. *Obstet. Gynecol.* **106**, 1059–1064.
- Gilmore A. P. and Burrige K. (1996) Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* **381**, 531–535.
- Guasch R. M., Tomas M., Minambres R., Valles S., Renau-Piqueras J. and Guerri C. (2003) RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J. Neurosci. Res.* **72**, 487–502.
- Guerri C., Pascual M. and Renau-Piqueras J. (2001) Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicol.* **22**, 593–599.
- Heacock A. M. and Agranoff B. W. (1997) CDP-diacylglycerol synthase from mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **1348**, 166–172.
- Jaffe A. B. and Hall A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247–269.
- Jalink K., van Corven E. J., Hengeveld T., Morii N., Narumiya S. and Moolenaar W. H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J. Cell Biol.* **126**, 801–810.
- Jones A. W. and Sternebring B. (1992) Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcohol.* **27**, 641–647.
- Jones D. R., Sanjuan M. A. and Merida I. (2000) Type I alpha phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid. *FEBS Lett.* **476**, 160–165.
- Joshi S., Guleria R. S., Pan J., Bayless K. J., Davis G. E., Dipette D. and Singh U. S. (2006) Ethanol impairs Rho GTPase signaling and differentiation of cerebellar granule neurons in a rodent model of fetal alcohol syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2859–2870.
- Klein J. (2005) Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J. Neurochem.* **94**, 1473–1487.
- Kranenburg O., Poland M., van Horek F. P., Dreschel D., Hall A. and Moolenaar W. H. (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galphal2/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1851–1867.
- Krulewicz C. J. (2005) Alcohol consumption during pregnancy. *Annu. Rev. Nurs. Res.* **23**, 101–134.
- Lanzetti L., Di Fiore P. P. and Scita G. (2001) Pathways linking endocytosis and actin cytoskeleton in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* **271**, 45–56.

- Lassing I. and Lindberg U. (1985) Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* **314**, 472–474.
- Lindmo K. and Stenmark H. (2006) Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J. Cell Sci.* **119**, 605–614.
- Logan M. R. and Mandato C. A. (2006) Regulation of the actin cytoskeleton by PIP₂ in cytokinesis. *Biol. Cell.* **98**, 377–388.
- Lykidis A., Jackson P. D., Rock C. O. and Jackowski S. (1997) The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J. Biol. Chem.* **272**, 33402–33409.
- Martínez S. E. and Egea G. (2007) Novel Molecular Targets for the prevention of fetal alcohol syndrome. *Recent Pat. on CNS Drug Discov.* **2**, 23–35.
- Moolenaar W. H., van Meerteren L. A. and Giepmans B. N. (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signalling. *Bioessays* **26**, 870–881.
- Offenhauser N., Castelletti D., Mapelli L. *et al.* (2006) Increased ethanol resistance and consumption in Eps8 knockout mice correlates with altered actin dynamics. *Cell* **127**, 213–226.
- Oude Weernink P. A., Guo Y., Zhang C., Schmidt M., Von Eichel-Streiber C. and Jakobs K. H. (2000) Control of cellular phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by adhesion signals and rho GTPases in NIH 3T3 fibroblasts involvement of both phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase and phospholipase C. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5237–5246.
- Oude Weernink P. A., Meletiadis K., Hommeltenberg S., Hinz M., Ishihara H., Schmidt M. and Jakobs K. H. (2004) Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J. Biol. Chem.* **279**, 7840–7849.
- Ramakers G. J. and Moolenaar W. H. (1998) Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp. Cell Res.* **245**, 252–262.
- Raucher D., Stauffer T., Chen W., Shen K., Guo S., York J. D., Sheetz M. P. and Meyer T. (2000) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell* **100**, 221–228.
- Ren X. D., Kioussis W. B. and Schwartz M. A. (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J.* **18**, 578–585.
- Renau-Piqueras J., Zaragoza R., De Paz P., Baguena-Cervellera R., Megias L. and Guerri C. (1989) Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 229–240.
- Ridley A. (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trend Cell Biol.* **16**, 522–529.
- Ridley A. J. and Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389–399.
- Riento K. and Ridley A. J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Cell Biol.* **4**, 446–456.
- Rothenfluh A., Threlkeld R. J., Bainton R. J. *et al.* (2006) Distinct behavioral responses to ethanol are regulated by alternate Rho-GAP18B isoforms. *Cell* **127**, 199–211.
- Sahai E., Alberts A. S. and Treisman R. (1998) RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* **17**, 1350–1360.
- Sakisaka T., Itoh T., Miura K. and Takenawa T. (1997) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3841–3849.
- Schaffert C. S., Todero S. L., Casey C. A., Thiele G. M., Sorrell M. F. and Tuma D. J. (2006) Chronic ethanol treatment impairs Rac1 and Cdc42 activation in rat hepatocytes. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **30**, 1208–1213.
- Shibasaki Y., Ishihara H., Kizuki N., Asano T., Oka Y. and Yazaki Y. (1997) Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J. Biol. Chem.* **272**, 7578–7581.
- Skippen A., Jones D. H., Morgan C. P., Li M. and Cockcroft S. (2002) Mechanism of ADP-ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 5823–5831.
- Slater S. J., Cook A. C., Seiz J. L., Malinowski S. A., Stagliano B. A. and Stubbs C. D. (2003) Effects of ethanol on protein kinase C alpha activity induced by association with Rho GTPases. *Biochem. J.* **371**, 12105–12114.
- Smythe E. and Ayscough K. R. (2006) Actin regulation in endocytosis. *J. Cell Sci.* **119**, 4589–4598.
- Tomás M., Fornas E., Megias L., Duran J. M., Portoles M., Egea G. and Renau-Piqueras J. (2002) Ethanol impairs monosaccharide uptake and glycosylation in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **83**, 601–612.
- Tomás M., Lázaro-Dieguez F., Duran J. M., Marin P., Renau-Piqueras J. and Egea G. (2003) Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes. *J. Neurochem.* **87**, 220–229.
- Tomás M., Marin P., Megias L., Egea G. and Renau-Piqueras J. (2005) Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiol. Dis.* **20**, 773–784.
- Tou J. S. and Gill J. S. (2005) Lysophosphatidic acid increases phosphatidic acid formation, phospholipase D activity and degranulation by human neutrophils. *Cell. Signal.* **17**, 77–82.
- Urso T., Gavaler J. S. and van Thiel D. H. (1981) Blood ethanol levels in sorber alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.* **28**, 1053–1056.
- Vemuri M. C. and Chetty C. S. (2005) Alcohol impairs astroglialogenesis by stem cells in rodent neurospheres. *Neurochem. Int.* **47**, 129–135.
- West J. R. and Blake C. A. (2005) Fetal alcohol syndrome: an assessment of the field. *Exp. Biol. Med.* **230**, 354–356.
- Yamamoto M., Hilgemann D. H., Feng S., Bito H., Ishihara H., Shibasaki Y. and Yin H. L. (2001) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J. Cell Biol.* **152**, 867–876.
- Yin H. L. and Janmey P. A. (2003) Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 761–789.
- Yoneda A., Multhaupt H. A. and Couchman J. R. (2005) The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity. *J. Cell Biol.* **170**, 443–453.
- Yonezawa N., Nishida E., Iida K., Yahara I. and Sakai H. (1990) Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.* **265**, 8382–8386.

SEGUNDO TRABAJO: “Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements.”

Enviado para su publicación

(ver página 133)

OBJETIVO 1. - Elucidar las vías de señalización a través de las cuales la exposición crónica a etanol afecta la organización del citoesqueleto de actina.

Nuestro objetivo era determinar que molécula(s) es (son) la(s) responsable(s) del aumento de la actividad RhoGAP observado en el primer trabajo en astrocitos expuestos a etanol. Los siguientes indicios nos indujeron a hipotetizar que las p190RhoGAPs (p190A y p190B) podían estar directamente implicadas: i) su expresión en el cerebro es elevada (Matheson y col., 2006); ii) es conocida su implicación en los procesos de crecimiento axonal y adhesión neuronal (Govek y col., 2005); iii) participan en el desarrollo neuronal (Brouns y col., 2000); iv) PKC (diana conocida del etanol) pueden activarlas (Brouns y col., 2000); v) muestran especificidad para Rho y Rac (Jacobs y Hall, 2005) y vi) a niveles bajos de PI(4,5)P₂ (efecto que ocurre por el etanol y descrito en nuestro primer trabajo) su afinidad por RhoA aumenta (Ligeti y col., 2004). Así pues, en este segundo trabajo observamos que en los astrocitos expuestos a etanol 1) no existen cambios de expresión de p190A y p190B, 2) hay un aumento de la actividad RhoGAP asociada a p190A y p190B, 3) se produce una mayor formación del complejo p190RhoGAP-p120RasGAP lo cual es indicativo de su mayor activación, 4) aumenta la unión a RhoA-GTP (su sustrato) y 5) tiene lugar una redistribución de las p190RhoGAPs del citoplasma a la periferia celular. Todas estas evidencias demuestran que en astrocitos expuestos crónicamente al etanol hay una mayor activación de p190RhoGAPs. Estas evidencias experimentales justifican pues la disminución de los niveles de RhoA-GTP y la reorganización de la actina descrita en el trabajo anterior.

Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements

Javier Selva* and Gustavo Egea**†

*Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, and Instituts d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) i de Nanociències i Nanotecnologia (IN²UB), Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain.

† Corresponding author: gegea@ub.edu

Abstract

We previously reported that cells chronically exposed to ethanol show alterations in actin cytoskeleton organization and dynamics in primary cultures of newborn rat astrocytes, a well-established *in vitro* model for foetal alcohol spectrum disorders. These alterations were attributed to a decrease in the cellular levels of active RhoA (RhoA-GTP), which in turn was produced by an increase in the total RhoGAP activity. We here provide evidence that p190RhoGAPs are the main factors responsible for such an increase. Astrocytes chronically exposed to ethanol show: (1) an increase in p190A- and p190B-associated RhoGAP activity; (2) higher binding of p190A and p190B to RhoA-GTP; (3) higher p120RasGAP-p190RhoGAP complex formation; and (4) the recruitment of both p190RhoGAPs to the cell periphery. Therefore, our data implicate p190RhoGAPs as directly responsible in the characteristic actin cytoskeleton alterations occurring in astrocytes following exposure to ethanol.

Introduction

Young and adult individuals who were prenatally exposed to ethanol as a consequence of ethanol consumption by their mother usually suffer a variety of psychological and organic alterations that are known as foetal alcohol spectrum disorders (FASD) (Riley and McGee 2005; Guerri et al. 2009). Among these disorders the most evident, and therefore, diagnosticable pathology is foetal alcohol syndrome (FAS). Individuals suffering from FAS usually present a characteristic facial pattern, growth deficiencies at pre- and postnatal stages, and mental retardation (Goodlett and Horn 2001; Riley and McGee 2005; Martínez and Egea 2007). Other FASD affected individuals usually exhibit an apparently normal phenotype, but show neurobehavioral deficiencies (Kelly et al. 2000; Mancinelli et al. 2006).

The dysfunction of essential cellular processes in the central nervous system (CNS) caused by ethanol teratogenicity lies at the basis of these pathologies. Of particular concern are the harmful effects of ethanol on the genesis, proliferation, survival, and internal organization of astrocytes (Guerri et al. 2001; Costa et al. 2004; Vemuri and Chetty 2005). Astroglial cells provide functional, structural and metabolic support to neurons (Bezzi and Volterra 2001; Pellerin et al. 2007). After vascular endothelial cells, astrocytes are the first cellular barrier to suffer the impact of ethanol and its harmful effects in the CNS. In this respect, rat astrocytes chronically exposed to ethanol exhibit a higher glucose uptake and alterations in the oligosaccharides on the cell surface (Tomás et al. 2002; Tomás et al. 2003). Both processes are particularly relevant because the former is essential for neuronal metabolism, and the latter for neuronal migration and glial-neuron contacts. Concurrently, we reported that some of the ethanol-induced alterations observed in a variety of subcellular processes such as change in the secretory and endocytic pathways could result from impairment of the actin cytoskeleton

organization and dynamics (Tomás et al. 2003; Tomás et al. 2004; Tomás et al. 2005). We reported that ethanol decreases actin stress fibres and induces a rearrangement of the actin cytoskeleton, which acquires a circular organization at the cell periphery (Tomás et al. 2003; Martínez et al. 2007). We then hypothesized that the molecular machinery that controls actin cytoskeleton organization could be responsible for these alterations. We thus focused our recent studies on the RhoGTPases as key regulators of actin organization in the cell (Jaffe and Hall 2005), especially RhoA. This was based on the following: (i) the expression of a constitutively active mutant of RhoA (RhoAV14) and treatment with lysophosphatidic acid (LPA), an activator of the RhoA/ROCK pathway, prevented and reverted, respectively, the ethanol-induced actin alterations (Tomás et al. 2003); and (ii) there was a strong decrease in the formation of stress fibres generated by the decrease in the active RhoA (RhoA-GTP) levels, which in turn was a consequence of an increase in total RhoGAP activity (Martínez et al. 2007). These results thus indicated that ethanol impairs the molecular machinery directly involved in the fine regulation of the activation-inactivation cycle of RhoA. Its active and inactive states are regulated by GEFs (guanine exchange factors) and GAPs (GTPase-activating proteins), which respectively generate active (RhoA-GTP) or inactive (RhoA-GDP) forms (Jaffe and Hall 2005). Total RhoGEF activity is not affected by ethanol exposure in newborn rat astrocytes (Martínez et al. 2007).

In the human genome around 70 different RhoGAPs have been identified so far (Tcherkezian and Lamarche-Vane 2007). We here study the potential involvement of p190RhoGAPs in ethanol-induced actin alterations for the following reasons: (i) they are highly expressed in the brain (Matheson et al. 2006); (ii) they are involved in axonal growth cones, neuronal adhesiveness (Govek et al. 2005) and development (Brouns et al. 2000); (iii) they are substrates of PKC, which in turn is a target of ethanol (Brouns et al. 2000); and (iv) they are specific for RhoA and Rac (Jacobs and Hall 2005), but their

affinity for the former is greatly enhanced when phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) levels are low (Ligeti et al. 2004), which occurs in ethanol-treated astrocytes (Martínez et al. 2007). The family of mammalian p190RhoGAPs includes two closely related members, p190A and p190B, both of which exhibit potent RhoGAP activity *in vitro* (Vincent and Settleman 1999). They are strongly related in overall structure and primary sequence, and widely expressed in mammalian tissues (Settleman et al. 1992; Burbelo et al. 1995; Brouns et al. 2000; Jacobs and Hall 2005; Matheson et al. 2006). Therefore, we concentrated on these two p190RhoGAPs, whose combined activity accounts for most of RhoGAP inhibition in mammalian cells (Vincent and Settleman 1999).

Results shown here indicate that ethanol enhances p190RhoGAPs activity, which provides insights into the molecular mechanisms responsible for the characteristic actin cytoskeleton alterations caused by chronic ethanol exposure in newborn rat astrocytes.

Material and Methods

Antibodies and reagents

The following polyclonal antibodies were used at their corresponding working dilution: anti-actin antibody from Cytoskeleton (Denver, CO, USA), 1/5,000; anti-p120RasGAP and anti-RhoGDIs from Santa Cruz (Delaware, CA, USA) both at 1/1,000; anti-RhoA-GTP from New East Biosciences (Malevern, PA, USA), at 1/1,000. Secondary polyclonal goat anti-rabbit and goat anti-mouse IgG HRP antibodies from Promega (Eugene, OR, USA), were both used at 1/3,000. Cyanine-3 (Cy3)- and Cyanine (Cy2)-conjugated mouse secondary antibodies were from Jackson Laboratories (CSH, USA) and used at 1/50. The monoclonal antibodies were: anti- α -tubulin and anti-GFAP antibodies from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and respectively used at 1/50,000

and 1/500; anti-p190A and anti-p190B were from BD Biosciences (San Jose, CA, USA), both used at 1/2,000 for Western blotting and 1/50 for immunofluorescence experiments. TRITC-phalloidin and FITC-phalloidin were purchased from Sigma-Aldrich and used at 0.02 mg/ml. γ -[32 P]-GTP was from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). DAPI was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ethanol was from Merck (Nottingham, UK).

Cell culture and ethanol treatment

HEK293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) foetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, 100 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. Cell cultures were maintained at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere.

Primary cultures of cortical astrocytes were prepared from newborn (P1) Wistar rats as previously reported (Martínez et al. 2007). Briefly, cells were plated into 75 cm² flasks in DMEM culture medium supplemented with 10 % FBS. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere and shaken overnight at 100 rpm in anaerobic conditions. Before reaching confluence, cells were replated and grown for at least 7 days in the absence or presence of ethanol (100 mM). The purity of astrocyte cultures was assessed by immunofluorescence using anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (Renau-Piqueras et al. 1989), which showed that cultures contained 90-95% of astrocytes. Ethanol was added once every 24 h. The ethanol concentration used in our study is comparable to the average amount found in the blood of ethanol-tolerant individuals and pregnant women (Urso et al. 1981; Church and Gerkin 1988; Jones and Sternebring 1992; Eckardt et al. 1998). All experiments using rats were approved by the appropriate institutional review committee and performed in

strict compliance with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Western blotting

Cell extracts were prepared from 100 mm-plate fresh cell cultures by adding 300 μ l of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl₂, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 7.4) containing protein (aprotinin, leupeptin and pepstatin A) and phosphatase (sodium orthovanadate and PMSF) inhibitors. Samples were incubated for 10 min on ice, then gently sonicated (two rounds of 5 s per sample) and finally centrifuged (1000xg for 10 min at 4°C). Protein was determined with the DC Protein Assay from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Equal amounts of lysates were loaded with loading buffer 5x (containing 10% β -mercaptoethanol), subjected to 10% (v/v) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred (90 min, 100 mV) to nitrocellulose membranes (Whatman, Maidstone, Kent, UK). Blots were blocked in 5% BSA/TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) for 1 h, and immunoblotted to test the various antigens listed above. Primary antibodies were diluted in PBS containing sodium azide and blots were incubated overnight at 4°C. The following day, blots were rinsed and incubated with secondary HRP-tagged IgG antibodies for 1 h in 5% BSA/TBST buffer. After several rinses, blots were developed for 4 min at room temperature with Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz, Delaware, CA, USA). Bands were visualized by exposure of the membrane to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Band intensities were measured by densitometry scanning of the film using Image J software. Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments.

Immunoprecipitation

Whole cell extracts were prepared by adding 500 μ l of modified RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 0.05 % SDS, 0.5 % Triton X-100, 0.1 % sodium deoxycholate, 2 mM EDTA) and processed as indicated above. Equal amounts of sample lysates were incubated overnight with the respective antibody (anti-p190A, anti-p190B or anti-RhoA-GTP antibodies) and with 50 μ l of 50% slurry of protein A-sepharose beads. The next day, beads were rinsed three times in modified RIPA buffer. Proteins were eluted from sepharose beads by adding 20 μ l of loading buffer 5x (containing 10% β -mercaptoethanol).

Immunofluorescence microscopy

Astrocytes were fixed in 4% formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, rinsed in PBS (3 x 5 min) and incubated in PBS containing 50 mM ammonium chloride. Cells were then permeabilized for 10 min with PBS containing 0.1% saponin and 1% BSA. Primary antibodies were incubated for 1 h, and secondary antibodies for 45 min in PBS containing 1% BSA. Actin cytoskeleton was visualized by incubating cells for 30 min with TRITC or FITC-labelled phalloidin. Coverslips were mounted onto microscope slides using Mowiol. Cells were observed on an Olympus BX60 epifluorescence microscope with a cooled Orca-ER CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan) or a Leica TCS SL laser-scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany). The images were processed using Adobe Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) and Image J software.

RhoGAP activity assays

To determine total RhoGAP activity, bacterially expressed RhoA was purified by standard procedures (Garcia-Mata et al. 2006) and loaded (3 μ g) with γ -[32 P]-GTP (5 μ Ci) for 10 min at 30°C. For the GTPase-activating protein (GAP) reaction, the [32 P]-GTP-loaded RhoA was incubated with lysates from untreated or ethanol-treated astrocytes in the presence of MgCl₂ (10 mM) at 30°C for 30 min (reaction kinetics was checked by the removal of aliquots at different times). The reaction mixture was subsequently fractionated in sodium molybdate/isopropyl acetate. A sample of the organic phase was counted by scintillation.

To determine RhoGAP activity of p190A and p190B, the respective immunoprecipitated fractions from HEK293T cells were incubated for 15 min at 37°C with lysates from astrocytes grown in the absence or presence of ethanol prior to the measurement of GTP hydrolysis.

Transfection

Plasmids were transfected into HEK293T cells using calcium phosphate (Guegan et al. 2008) or with Lipofectamine 2000, following the manufacturer's recommendations.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni's multiple comparison test, or Student's *t* test (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

Results

Ethanol does not alter protein content of p190RhoGAPs expressed in rat astrocytes

It has been reported in different cell types that there are two isoforms of p190RhoGAP, p190A and p190B (Matheson et al. 2006; Guegan et al. 2008), but their presence in rat astrocytes was unknown. Thus, we first examined the expression of both p190RhoGAPs in this cell type. Both p190A and p190B were expressed in total cell extracts of rat astrocytes (Fig. 1A). However, their respective protein levels were not altered by ethanol exposure (Fig. 1B). This result did not rule out their potential involvement in the total RhoGAP activity increase produced by ethanol (Martínez et al. 2007), since it is possible that the RhoGAP activity of p190 isoforms could be perturbed by ethanol without any change in their protein content. Therefore, we next proceeded to check this possibility.

Ethanol increases the RhoGAP activity of p190A and p190B

We first attempted to measure the RhoGAP activity of immunoprecipitated p190A and p190B from lysates of untreated and ethanol-treated astrocytes. Unfortunately, we were unable to detect in any RhoGAP activity of p190A and p190B despite having successfully immunoprecipitated them from lysates (*L* for Lysates and *P* for immunoprecipitated fraction in Fig. 2Ai and ii). It is important to highlight that it was not a problem of the RhoGAP assay since we carried out parallel experiments to confirm that indeed ethanol increased total RhoGAP activity (Fig. S1 and Martínez et al. 2007). Then, we reasoned that if p190RhoGAPs mostly contribute to the ethanol-induced increase of the RhoGAP activity, such an increase should not be produced in samples immunodepleted of p190RhoGAPs. Thus, we measured the total RhoGAP activity that remained in the supernatant after the respective p190 isoform

immunoprecipitations (Fig. 2A). The presence of p190A and p190B in the supernatants was greatly reduced or undetectable after their respective immunoprecipitation (*S* for supernatant in Fig. 2Ai and ii). RhoGAP activity measured in the respective supernatants showed no difference between control and ethanol-treated samples (Fig. 2Ai and ii). When p190A and p190B were both immunodepleted from lysates simultaneously, there was even a significant decrease (about 30%) in the RhoGAP activity of the supernatant from ethanol-treated samples (Fig. 2Aiii). This result indirectly indicates that p190A and p190B RhoGAPs significantly contribute to the increased total RhoGAP activity produced by ethanol.

Our inability to measure RhoGAP activity from immunoprecipitated p190RhoGAPs may have been due to the absence of cofactors. To test this possibility, we first immunoprecipitated p190A or p190B from human HEK293T cells, where both p190RhoGAPs are highly expressed and share 95% homology with their rat orthologues. Thereafter, we incubated the respective p190 immunoprecipitated fractions with lysates from untreated or ethanol-treated astrocytes. We reasoned that these lysates should contain the cofactors necessary to activate immunoprecipitated p190RhoGAPs, and therefore allow us to measure their intrinsic RhoGAP activities. Thus, there was a significant increase in the RhoGAP activity from immunoprecipitated p190A or p190B (35% and 50%, respectively) when they were incubated with lysates from ethanol-exposed samples (Fig. 2B). To be completely sure that we were indeed measuring the RhoGAP activity from p190 in the previous assay, HEK293T cells were transfected with a plasmid expressing the constitutively inactive mutant form of p190A (p190-RA or p190^{R1283A}) (Noren et al. 2003) (Fig. S2A). We then proceeded with the same experimental approach as indicated above and, as we expected, the p190A RhoGAP activity decreased significantly (Fig. S2B). p190B RhoGAP activity was not measured because p190-RA mutant is exclusive to the p190A isoform (Fig. S2C). Taken together,

these results show that: (i) ethanol produces the activation of p190A and p190B, and (ii) cofactors are necessary for their activation (see below).

Finally, another method for examining p190RhoGAP activation was to measure the binding to its substrate RhoA-GTP (Noren et al. 2003; Guegan et al. 2008). Lysates from untreated and ethanol-exposed astrocytes were immunoprecipitated with a commercially available antibody specific to RhoA-GTP (see Material and Methods). Thereafter, the presence of p190A or p190B was analyzed by Western blotting. Co-immunoprecipitation of both p190RhoGAPs was greater in ethanol than in control samples (Fig. 2C), which corroborates that both p190A and p190B are indeed more activated in ethanol-exposed cells.

Ethanol promotes the p190RhoGAP-p120RasGAP complex formation

Potential cofactors to explain the ethanol-induced increase in p190RhoGAPs activity include p120RasGAP. The formation of a complex between both proteins is essential for p190RhoGAP activity (Pixley et al. 2005; Bradley et al. 2006; Huot et al. 2009). Therefore, we reasoned that ethanol should also stimulate the formation of this protein complex. To test this possibility, we first immunoprecipitated p190A or p190B from extracts of control and ethanol-treated astrocytes. Thereafter, we examined by Western blotting the presence of p120RasGAP in each p190A or p190B immunoprecipitated fraction. We observed that more p120RasGAP co-immunoprecipitated with p190A in ethanol-exposed samples (Fig. 3A, C). However, the complex formed between p190B and p120RasGAP was practically undetectable (Fig. 3B), which confirms that the interaction with p120RasGAP is exclusive to the p190A isoform (Matheson et al. 2006). Therefore, the results corroborate the above mentioned increase in p190A RhoGAP activity caused by ethanol, and also point to p120RasGAP as a cofactor necessary for the ethanol-induced activation at least for p190A.

Ethanol stimulates the recruitment of p190RhoGAPs to the cell periphery

p190RhoGAPs must be recruited to the plasma membrane to inactivate RhoGTPases (Bradley et al. 2006; Tomar et al. 2009). Therefore, we examined by confocal microscopy the subcellular distribution of p190A and p190B in untreated and ethanol-treated astrocytes. In control cells, p190A and p190B were mainly localized in the nucleus and to a much lesser extent in the perinuclear cytoplasm (Fig. 4A and B). Ethanol treatment induced their redistribution to the cell periphery as observed in confocal images obtained from the base of cells (Fig. 4A and B, arrowheads). Double labelling with phalloidin was carried out to show: (i) the actin cytoskeleton rearrangements caused by ethanol exposure, which consists of a decrease in actin stress fibres and of the formation of peripheral actin bundles (Tomás et al. 2003; Martínez et al. 2007), and (ii) the cell periphery (Fig. 4A and B). As shown in insets of Fig. 4A and B, ethanol-treated cells showed a higher level of localization of both p190RhoGAPs at the cell periphery. Moreover, this ethanol-induced recruitment of both p190RhoGAPs to the cell periphery is in turn demonstrative of their activation.

Discussion

Here we report that in rat astrocytes the ethanol-induced increase in total RhoGAP activity that accompanies actin cytoskeleton rearrangement is mainly caused by the activation of p190A and p190B RhoGAPs. Whereas both participate in axon guidance (Chardin 2006) and neural development (Brouns et al. 2000) in neurons, very little is known about their expression and functional relevance in other neural cell types. For instance, they are involved in oligodendrocyte differentiation (Wolf et al. 2001; Wang

et al. 2009). Our study shows for the first time the presence and the importance of p190RhoGAPs in astrocytes.

As indicated in the introduction, the ethanol-induced increase of the total RhoGAP activity in rat astrocytes led us to focus on RhoGAPs. One explanation of this result was that chronic ethanol exposure could upregulate the protein levels of p190RhoGAPs, which are the main source of cellular RhoGAP activity (Vincent and Settleman 1999). However, the observation that ethanol did not produce this alteration led us to hypothesize that their intrinsic RhoGAP activity had increased. We vindicated this hypothesis experimentally. Thus, p190RhoGAPs from ethanol-treated samples showed a much higher capability to bind RhoA-GTP. Whereas we could not directly measure RhoGAP activity from immunoprecipitated p190A or p190B, the expected ethanol-induced p190RhoGAPs activity increase was directly confirmed only when immunoprecipitated p190A or p190B fractions were incubated in the presence of extracts from ethanol-exposed astrocytes. In this case there was an increase in their intrinsic RhoGAP activity of about 35% and 50%, respectively, in comparison to untreated cells. Furthermore, p190A or p190B immunodepleted fractions from ethanol-exposed astrocytes showed no difference in the total RhoGAP activity respect to control samples. When both p190 isoforms were immunoprecipitated simultaneously and the total RhoGAP activity of the supernatant was measured, there was even a significant decrease in ethanol samples. This suggests that, as expected, most of the total RhoGAP activity was attributable to p190RhoGAPs.

As mentioned above, the initial impossibility of directly assaying the RhoGAP activity of immunoprecipitated p190A or p190B from lysates of control and ethanol-exposed astrocytes suggested that other molecular components were necessary for the activation of both isoforms. The observation that more p120RasGAP co-immunoprecipitated with p190A in ethanol samples supports our hypothesis. At the same time it indicates higher

p190A RhoGAP activity. Many RhoGAPs are regulated by phosphorylation (Jacobs and Hall 2005) and/or interactions with other factors like the mammalian Ras regulator p120RasGAP (Bradley et al. 2006). Therefore, the involvement of p120RasGAP is not surprising. Indeed, the association between phosphorylated PDGF α receptor subunit and p120RasGAP has also been reported in astrocytes which in that case was inhibited by ethanol, leading to alterations in cell proliferation (Luo and Miller 1999). Nevertheless, in our case the p120RasGAP-p190RhoGAP interaction does not explain the totality of the increase in p190RhoGAPs activity induced by ethanol, since p120RasGAP does not co-immunoprecipitate with p190B (our own results and Matheson et al. 2006). Moreover, other p190RhoGAP partners and activity modulators could also be involved, such as p120 catenin (Wildenberg et al. 2006) and the focal adhesion kinase (FAK) (Tomar and Schlaepfer 2009). At the moment, we do not know which cofactors interact to facilitate activation of p190B.

In addition, we show that ethanol stimulates the recruitment of p190A and p190B to the cell periphery. This is also indicative of the activation of p190RhoGAPs in ethanol-exposed cells. This translocation cannot occur without the presence of other molecular partners, including p120RasGAP (Bradley et al. 2006). This is consistent with our observation that ethanol promoted the complex formation between p190A and p120RasGAP (Fig. 3). FAK also participates in this recruitment to the plasma membrane (Tomar and Schalepfer 2009). The potential involvement of FAK could, in turn, involve the participation of p190RhoGAPs in focal adhesion dynamics and therefore in cellular adhesion and migration. In this respect, ethanol perturbs focal adhesion formation (Miñambres et al. 2006) and neuronal migration (Carter et al. 2008). We thus hypothesize that p190RhoGAPs are involved in this alteration.

Our results point to a molecular mechanism by which actin dynamics and organization are affected by ethanol in glial cells, which implicates p190RhoGAPs. This is consistent

with what has been reported in other models of neurological disorders. In *Drosophila*, neuronal RhoGAP18B gene mutations confer resistance to the sedating effects of ethanol (Rothenfluh et al. 2006). In a parallel study, mice lacking Eps8, a regulator of actin dynamics under the control of Rac (Di Fiore and Scita 2002), were more resistant to the actin remodelling induced by ethanol. Consequently, these mice were also more resistant to its sedative effects and showed higher ethanol consumption (Offenhäuser et al. 2006). Therefore, changes in the activity of RhoGTPases induced by ethanol affect the regulation of the actin cytoskeleton both in neuronal and, as our results now indicate, in glial cells. All these alterations collectively contribute to the appearance of a variety of well-characterised harmful effects in cellular processes. Such effects finally lead to cognitive disorders that are associated with the consumption of alcohol and/or other addictive substances (Gourley et al. 2009). In the case of FASD, both behavioural and cognitive alterations begin during neural development (Govek et al. 2005). Thus, it has been postulated that p190A can influence fear-conditioning through alterations in the axon and dendritic structures as a consequence of actin cytoskeleton rearrangement (Lamprecht et al. 2002). Moreover, such dendritic alterations (in which p190A is involved) induced behavioural flexibility and sensitivity to cocaine in adolescent brains (Gourley et al. 2009). Furthermore, since the enhancement of the activity of RhoGTPases in the brain correlates with an improvement in learning and memory (Diana et al. 2007), their impairment by ethanol provides additional evidence of their involvement in FASD. Thus, RhoGTPases are considered as common targets of addictive substances, and in our case, the activation of RhoGAP activity by ethanol seems to be an important mechanism for explaining the dysfunction of RhoA (Martínez et al. 2007).

Finally, we postulate a working model (Fig. 5) in which ethanol impairs the RhoA/ROCK pathway by an abnormal increase in p190RhoGAP activity, which in turn

reduces the RhoA-GTP pool (Martínez et al. 2007), with the subsequent translocation to the cytoplasm of the resulting inactive RhoA (RhoA-GDP), the reduction of actin stress fibres and the appearance of peripheral actin rearrangement. This effect is mostly mediated by the increase in p190RhoGAPs at the cell periphery, which is facilitated by a greater interaction with p120RasGAP (Fig. 5). However, the degree of phosphorylation of p190 isoforms in cells exposed to ethanol, and the contribution of other factors to the increase in the p190RhoGAPs/RhoA-GTP interaction remain to be determined (indicated as dotted lines in Fig. 5) (Brouns et al. 2001; Sordella et al. 2003; Hernández et al. 2004; Mori et al. 2009). Our group is currently working on this, in search of a fuller understanding of the mechanisms by which chronic ethanol exposure leads to the alteration of actin dynamics.

The results reported here could be extrapolated to other cell types particularly sensitive to ethanol exposure such as neurons and hepatocytes since the molecular machinery that governs actin dynamics and organization is largely common between mammalian cells.

Acknowledgments

This study was supported by grants BFU 2009-07186 and NanoBioMed CONSOLIDER CSD 2006-00012. We thank Susana E. Martínez for advice in the initial phase of this study, Keith Burridge and Piero Crespo for kindly providing the constructs EGFP-p190RhoGAP^{R1283A} and pGEX-GSTRhoA, respectively, Isabel Fabregat and Juan M. Duran for comments on the manuscript, and finally Maite Muñoz and Robin Rycroft for technical support and editorial assistance, respectively.

REFERENCES

- Bezzi P, Volterra A. (2001) A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 387-394.
- Bradley WD, Hernández SE, Settleman J, Koleske AJ. (2006) Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4827-4836.
- Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, Settleman J. (2000) The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **127**, 4891-4903.
- Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. (2001) p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 361-367.
- Burbelo PD, Miyamoto S, Utani A, Brill S, Yamada KM, Hall A, Yamada Y. (1995) p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J. Biol. Chem.* **270**, 30919-30926.
- Carter JJ, Tong M, Silbermann E, Lahousse SA, Ding FF, Longato L, Roper N, Wands JR, de la Monte SM. (2008) Ethanol impaired neuronal migration is associated with reduced aspartyl-asparaginyl-beta-hydroxylase expression. *Acta Neuropathol.* **116**, 303-315.
- Chardin P. (2006) Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 54-62.
- Church MW, Gerkin KP. (1988) Hearing disorders in children with fetal alcohol syndrome: findings from case reports. *Pediatrics* **82**, 147-154.
- Costa LG, Vitalone A, Guizzetti M. (2004) Signal transduction mechanisms involved in the antiproliferative effects of ethanol in glial cells. *Toxicol Lett.* **149**, 67-73

- Di Fiore PP, Scita G. (2002) Eps8 in the midst of GTPases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1178-1183.
- Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, Meschini S, Fabbri A, Fiorentini C. (2007) Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 636-641.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, *et al* (1998) Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **22**, 998-1040.
- García-Mata R, Wennerberg K, Arthur WT, Noren NK, Ellerbroek SM, Burridge K. (2006) Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol.* **406**, 425-37.
- Goodlett CR, Horn KH. (2001) Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res. Health* **25**, 175-184.
- Gourley SL, Koleske AJ, Taylor JR. (2009) Loss of dendrite stabilization by the Abl-related gene (Arg) kinase regulates behavioral flexibility and sensitivity to cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **106**, 16859-16864.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* **19**, 1-49.
- Guegan F, Tatin F, Leste-Lasserre T, Drutel G, Genot E, Moreau V. (2008) p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J. Cell Sci.* **121**, 2054-2061.
- Guerra C, Pascual M, Renau-Piqueras J. (2001) Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* **22**, 593-599.
- Guerra C, Bazinet A, Riley EP. (2009) Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol.* **44**, 108-114.

- Hernández SE, Settleman J, Koleske AJ. (2004) Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr. Biol.* **14**, 691-696.
- Huot ME, Brown CM, Lamarche-Vane N, Richard S. (2009) An adaptor role for cytoplasmic Sam68 in modulating Src activity during cell polarization. *Mol. Cell Biol.* **29**, 1933-1943.
- Jacobs T, Hall C. (2005) Rho GAPs - Regulators of Rho GTPases and More, in Rho Family GTPases (Manser E, ed), Vol. 3, pp. 93-112. Springer, Dordrecht (Netherlands).
- Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 247-269.
- Jones AW, Sternebring B. (1992) Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcohol.* **27**, 641-647.
- Kelly SJ, Day N, Streissguth AP. (2000) Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species. *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 143-149.
- Lamprecht R, Farb CR, LeDoux JE. (2002) Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. *Neuron* **36**, 727-738.
- Ligeti E, Dagher MC, Hernández SE, Koleske AJ, Settleman J. (2004) Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J. Biol Chem.* **279**, 5055-5058.
- Luo J, Miller MW. (1999) Platelet-derived growth factor-mediated signal transduction underlying astrocyte proliferation: site of ethanol action. *J. Neurosci.* **19**, 10014-10025.
- Mancinelli R, Binetti R, Ceccanti M. (2006) Female drinking, environment and biological markers. *Ann. Ist. Super. Sanita.* **42**, 31-38.

- Martínez SE, Egea G. (2007) Novel molecular targets for the prevention of fetal alcohol syndrome. *Recent Pat. CNS Drug Discov.* **2**, 23-35.
- Martínez SE, Lázaro-Diéguez F, Selva J, Calvo F, Piqueras JR, Crespo P, Claro E, Egea G. (2007) Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol. *J. Neurochem.* **102**, 1044-1052.
- Matheson SF, Hu KQ, Brouns MR, Sordella R, VanderHeide JD, Settleman J. (2006) Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Dev. Neurosci.* **28**, 538-550.
- Miñambres R, Guasch RM, Perez-Aragó A, Guerri C. (2006) The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J. Cell Sci.* **119**, 271-282.
- Mori K, Amano M, Takefuji M, Kato K, Morita Y, Nishioka T, Matsuura Y, Murohara T, Kaibuchi K. (2009) Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J. Biol. Chem.* **284**, 5067-5076.
- Noren NK, Arthur WT, Burridge K. (2003) Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J. Biol. Chem.* **278**, 13615-13618.
- Offenhäuser N, Castelletti D, Mapelli L. *et al* (2006) Increased ethanol resistance and consumption in Eps8 knockout mice correlates with altered actin dynamics. *Cell* **127**, 213-226.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* **55**, 1251-1262.
- Pixley FJ, Xiong Y, Yu RY, Sahai EA, Stanley ER, Ye BH. (2005) BCL6 suppresses RhoA activity to alter macrophage morphology and motility. *J. Cell Sci.* **118**, 1873-1883.

- Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P, Baguena-Cervellera R, Megias L, Guerri C. (1989) Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J. Histochem. Cytochem.* **37**, 229-240.
- Riley EP, McGee CL. (2005) Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp. Biol. Med.* **230**, 357-365.
- Rothenfluh A, Threlkeld RJ, Bainton RJ, Tsai LT, Lasek AW, Heberlein U. (2006) Distinct behavioral responses to ethanol are regulated by alternate RhoGAP18B isoforms. *Cell.* **127**, 199-211.
- Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA. (1992) Association between GTPase activators for Rho and Ras families. *Nature* **359**, 153-154.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. (2003) Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell* **113**, 147-158.
- Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell.* **99**, 67-86.
- Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD. (2009) A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* **122**, 1852-1862.
- Tomar A, Schlaepfer DD. (2009) Focal adhesion kinase: switching between GAPs and GEFs in the regulation of cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 676-683.
- Tomás M, Fornas E, Megías L, Durán JM, Portolés M, Guerri C, Egea G, Renau-Piqueras J. (2002) Ethanol impairs monosaccharide uptake and glycosylation in cultured rat astrocytes. *J. Neurochem.* **83**, 601-612.
- Tomás M, Lázaro-Diéguez F, Durán JM, Marín P, Renau-Piqueras J, Egea G. (2003) Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced

- injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes. *J. Neurochem.* **87**, 220-229.
- Tomás M, Durán JM, Lázaro-Diéguez F, Babià T, Renau-Piqueras J, Egea G. (2004) Fluorescent analogues of plasma membrane sphingolipids are sorted to different intracellular compartments in astrocytes; Harmful effects of chronic ethanol exposure on sphingolipid trafficking and metabolism. *FEBS Lett.* **563**, 59-65.
- Tomás M, Marín P, Megías L, Egea G, Renau-Piqueras J. (2005) Ethanol perturbs the secretory pathway in astrocytes. *Neurobiol. Dis.* **20**, 773-784.
- Urso T, Gavaler JS, Van Thiel DH. (1981) Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.* **28**, 1053-1056.
- Vemuri MC, Chetty CS. (2005) Alcohol impairs astroglial stem cells in rodent neurospheres. *Neurochem. Int.* **47**, 129-135.
- Vincent S, Settleman J. (1999) Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur. J. Cell Biol.* **78**, 539-548.
- Wang PS, Wang J, Xiao ZC, Pallen CJ. (2009) Protein-tyrosine phosphatase alpha acts as an upstream regulator of Fyn signaling to promote oligodendrocyte differentiation and myelination. *J. Biol. Chem.* **284**, 33692-33702.
- Wennerberg K, Forget MA, Ellerbroek SM, Arthur WT, Burridge K, Settleman J, Der CJ, Hansen SH. (2003) Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr. Biol.* **13**, 1106-1115.
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. (2006) p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell* **127**, 1027-1039.
- Wolf RM, Wilkes JJ, Chao MV, Resh MD. (2001) Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J. Neurobiol.* **49**, 62-78.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. p190RhoGAPs are expressed in primary cultures of rat astrocytes. A) Western blot showing p190RhoGAPs (p190A and p190B) protein content in total lysates from rat astrocytes on different culture days in the presence or absence of ethanol (100 mM). B) Quantitation of results shown in A clearly indicates that there was no variation in p190RhoGAPs protein content. Values are the mean \pm SD from three independent experiments. CTRL: control; EtOH: control.

Figure 2. p190RhoGAPs activity is increased in astrocytes chronically exposed to ethanol. A) Total RhoGAP activity from lysates immunodepleted for p190A, p190B or both at the same time (i, ii, and iii, respectively). Values are the mean \pm SD three independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.05$ (*). B) p190RhoGAPs activity was measured in immunoprecipitated p190A or p190B incubated with total lysates of astrocytes grown in the absence (control) or presence of ethanol. Values are the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.05$ (*). C) p190A and p190B levels bound to active RhoA-GTP from total extracts of untreated or ethanol-treated astrocytes. Values in the quantitative analysis are the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.05$ (*); $p \leq 0.001$ (***). L: lysates; S: supernatant; P: immunoprecipitated fraction.

Figure 3. Ethanol promotes the formation of p120RasGAP-p190RhoGAP complex. A and B) p120RasGAP levels co-immunoprecipitated with p190A (A) or p190B (B) in ethanol-exposed astrocytes. C) Quantitative analysis of results shown in A. Values are

the mean \pm SD from three independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.01$ (**).

Figure 4. Ethanol stimulates the redistribution of p190RhoGAPs to the cell periphery. A and B) Confocal microscopy stack images that include the plasma membrane and the subplasmalemmal cytoplasm (cell periphery) of control and ethanol-treated astrocytes co-stained for F-actin and p190A or p190B isoforms with phalloidin and monoclonal antibodies, respectively. Ethanol-exposed astrocytes show the characteristic actin cytoskeleton rearrangement and the recruitment of p190A and p190B to the plasma membrane (arrowheads) and cell periphery. Insets show reslices of the cell periphery in the Z axis from the confocal stacks. Scale bar: 10 μ m.

Figure 5. Signalling model involved in the actin cytoskeleton rearrangements produced by chronic ethanol in astrocytes. On the left, potential situation in normal conditions, wherein the RhoA/ROCK pathway operates correctly to produce actin stress fibres and the p190RhoGAPs are localized in the cytoplasm. On the right, cells exposed to chronic ethanol, which increases p190RhoGAPs activity, leading to an abnormal decrease of RhoA-GTP endogenous pool. Consequently, the RhoA/ROCK signalling pathway is perturbed and stress fibre formation is diminished, which is accompanied by the formation of peripheral actin cytoskeleton rearrangement. p190RhoGAPs display a higher association with RhoA-GTP in the plasma membrane, and the p190A-p120RasGAP complex participates in this increased interaction. Finally, we include in the model the putative involvement of other activators of p190RhoGAPs that are known to induce their phosphorylation *in vitro* (dotted lines). Notice that the thickness of the arrows reflects the different level of activation of the signalling pathway in untreated and in ethanol-treated cells. ROCK: Rho Kinase, FAK: Focal Adhesion Kinase, GDI:

Guanine Dissociation Inhibitor, MLCK: myosin light chain kinase, Src: Src kinase, Abl: Abl kinase, IGF-1R: insulin-like growth factor 1 receptor.

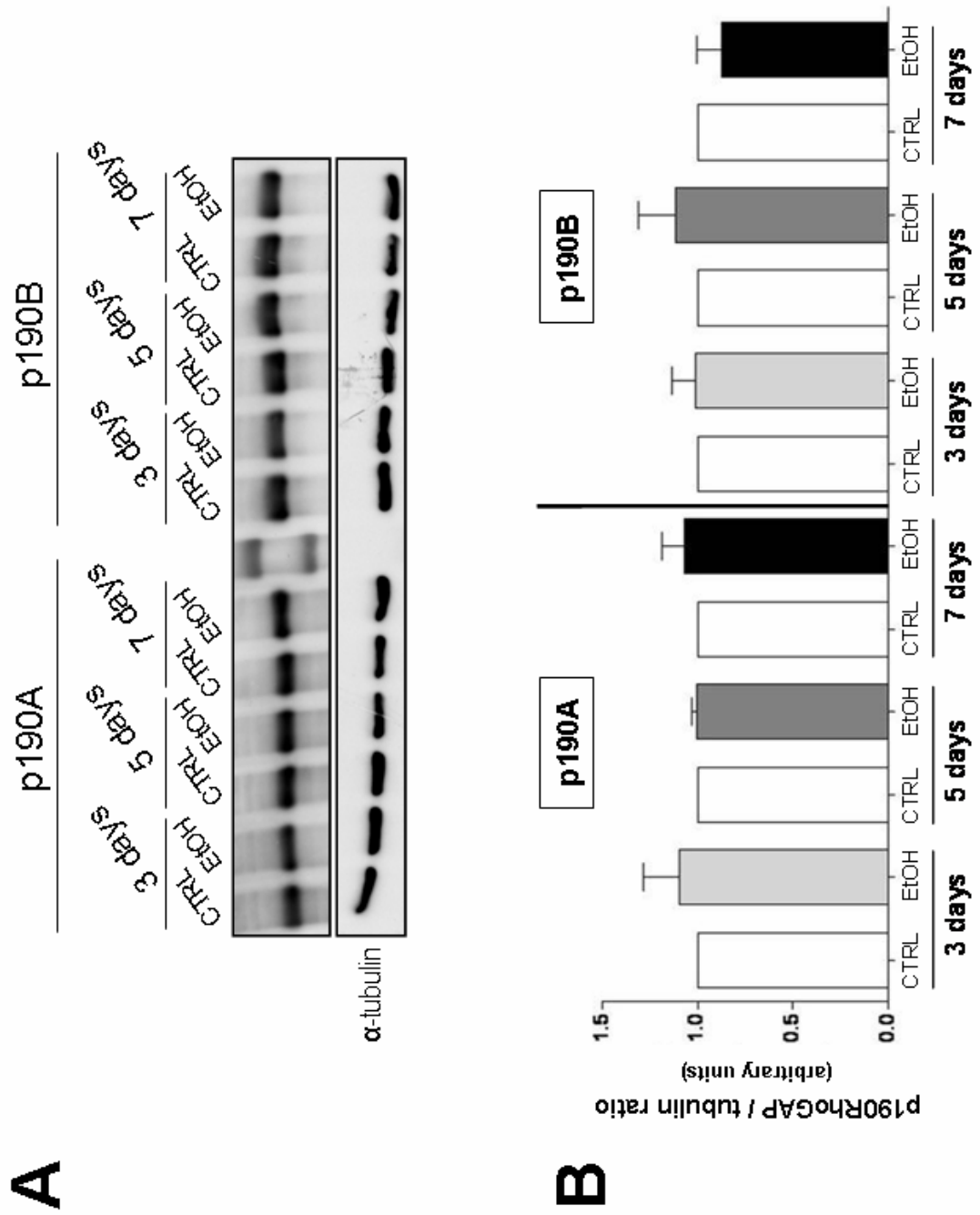
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Ethanol increases total RhoGAP activity. Total RhoGAP activity in total lysates from rat astrocytes grown in the absence or presence of ethanol (100 mM) for 7 days. Values are the mean \pm SD from seven independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.001$ (***)

Figure S2. Cells expressing a constitutively inactive mutant of p190A exhibit a decrease in p190A activity. A) Phase contrast and epifluorescent (GFP) pictures from mock and p190-RA-transfected HEK293T cells. Scale bar: 20 μ m. B) p190A RhoGAP activity assays in mock and p190-RA-transfected cells. Values are the mean \pm SD from four independent experiments. Statistical significance using the Student's *t* test, $p \leq 0.001$ (***)

C) p190-RA (band above p190 kD) is immunoprecipitated only with anti-p190A. On the left, a more exposed film from the same experiment reflects the difference in rates of expression between endogenous p190A and p190-RA transfected cells. On the right, notice that after immunoprecipitation with anti-p190B, the upper electrophoretic band corresponding to p190-RA did not appear when using anti-p190B antibodies.

Figure 1



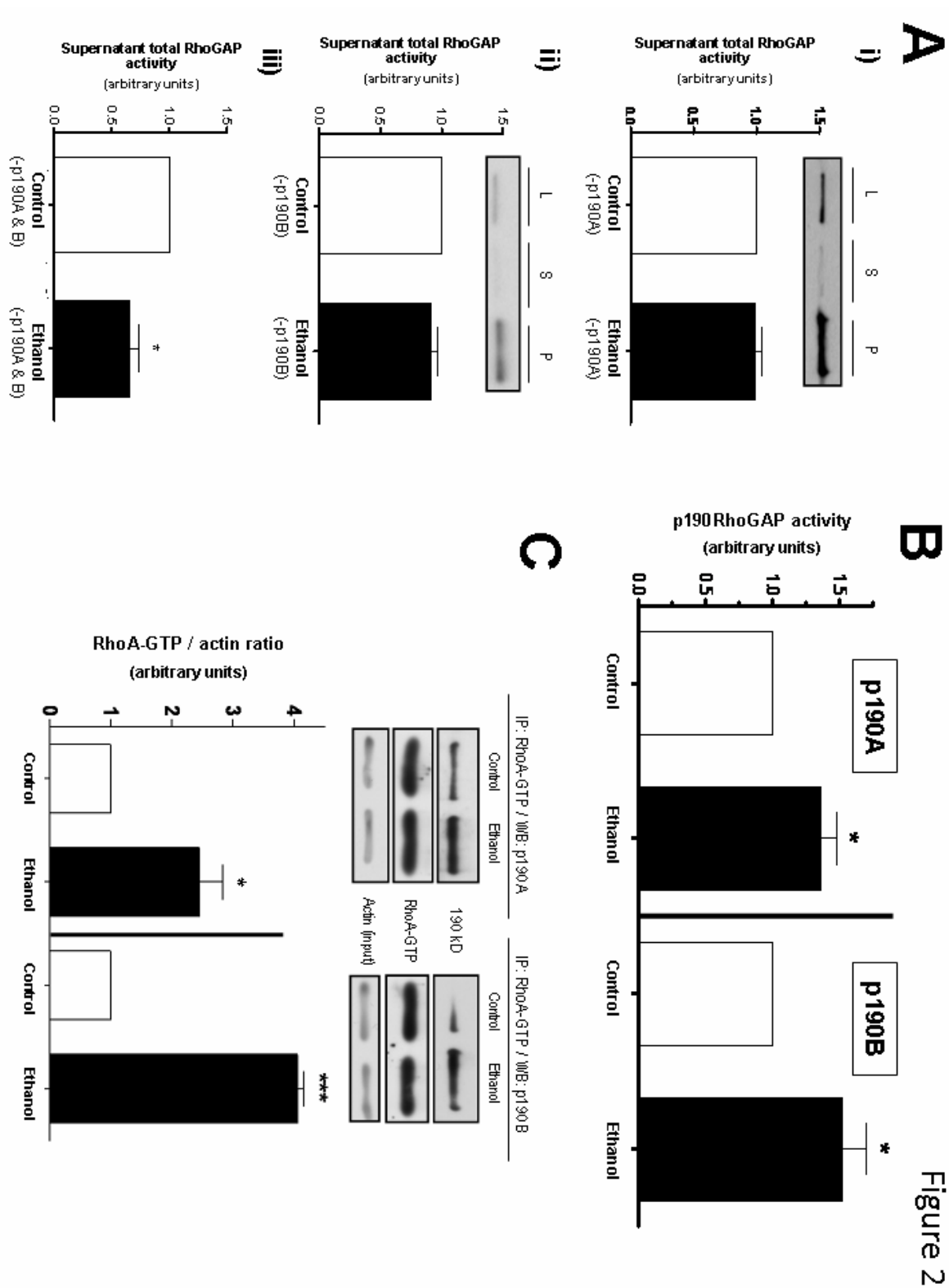
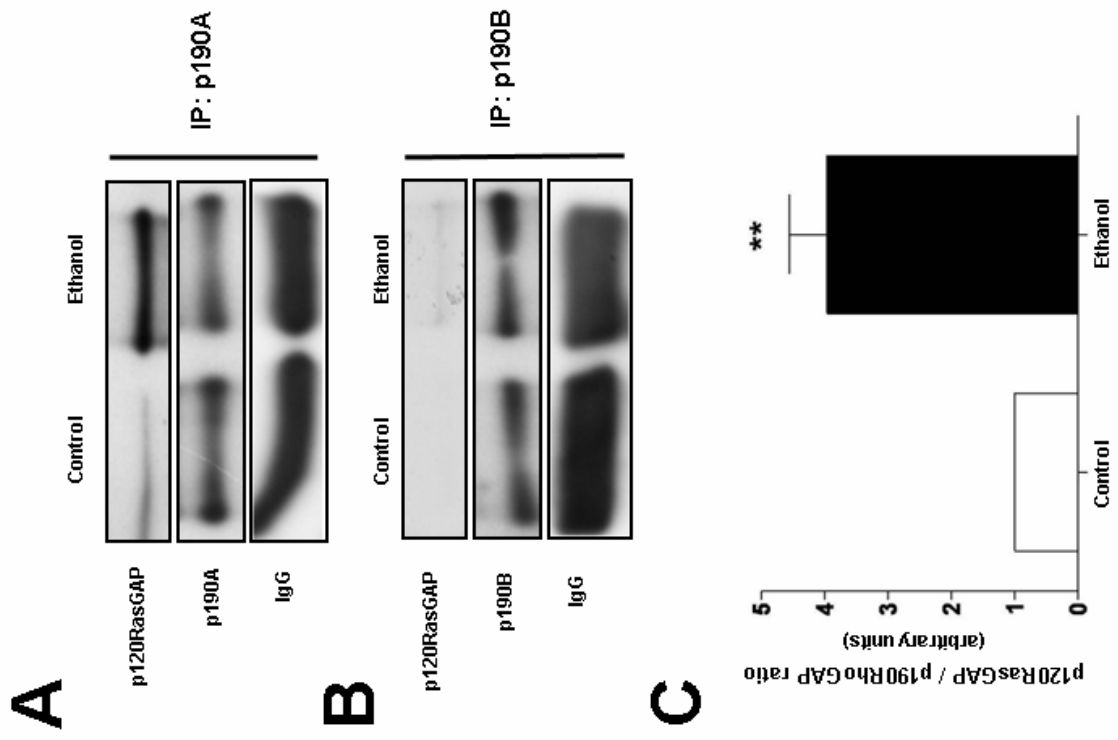


Figure 2

Figure 3



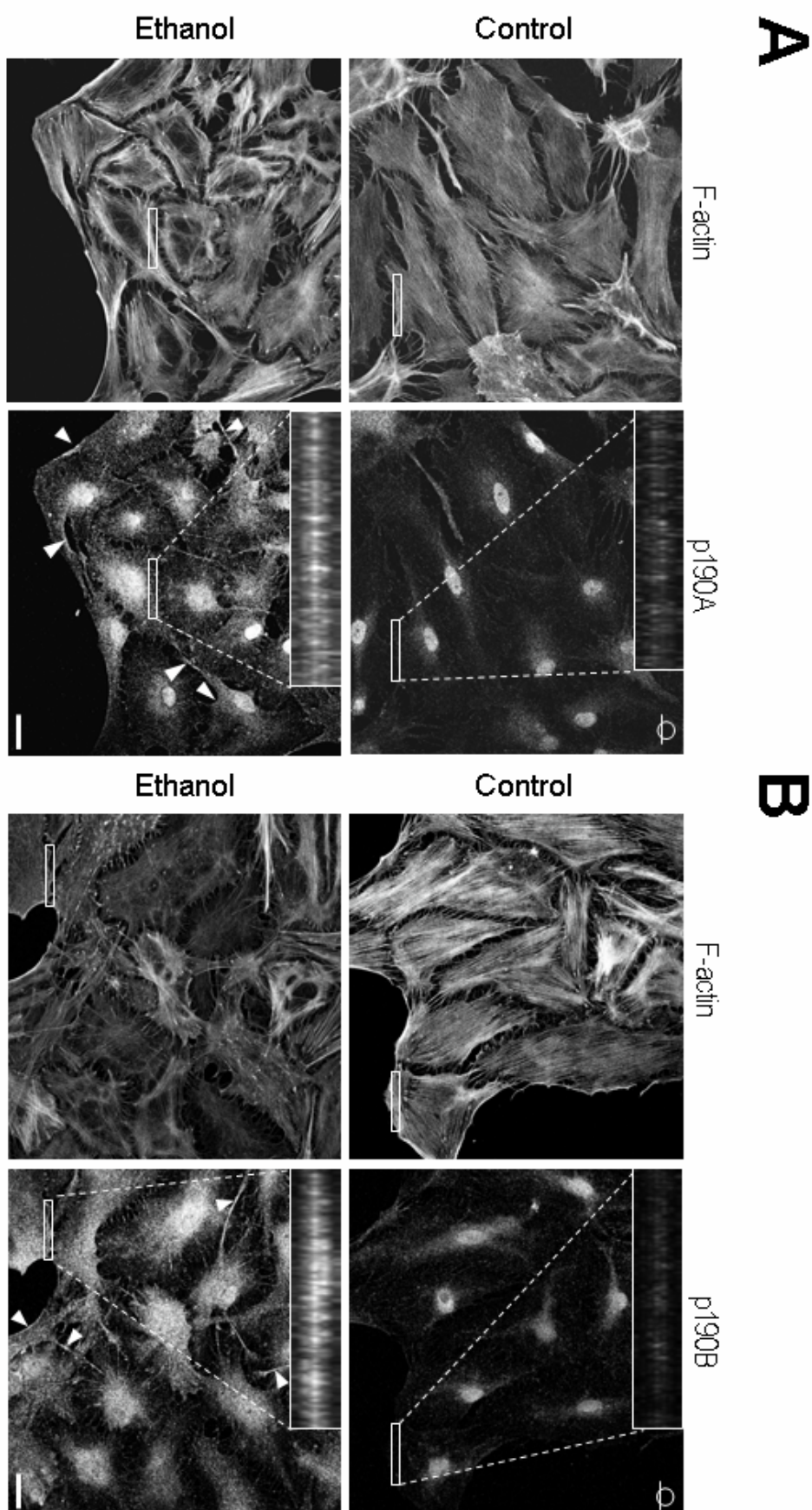
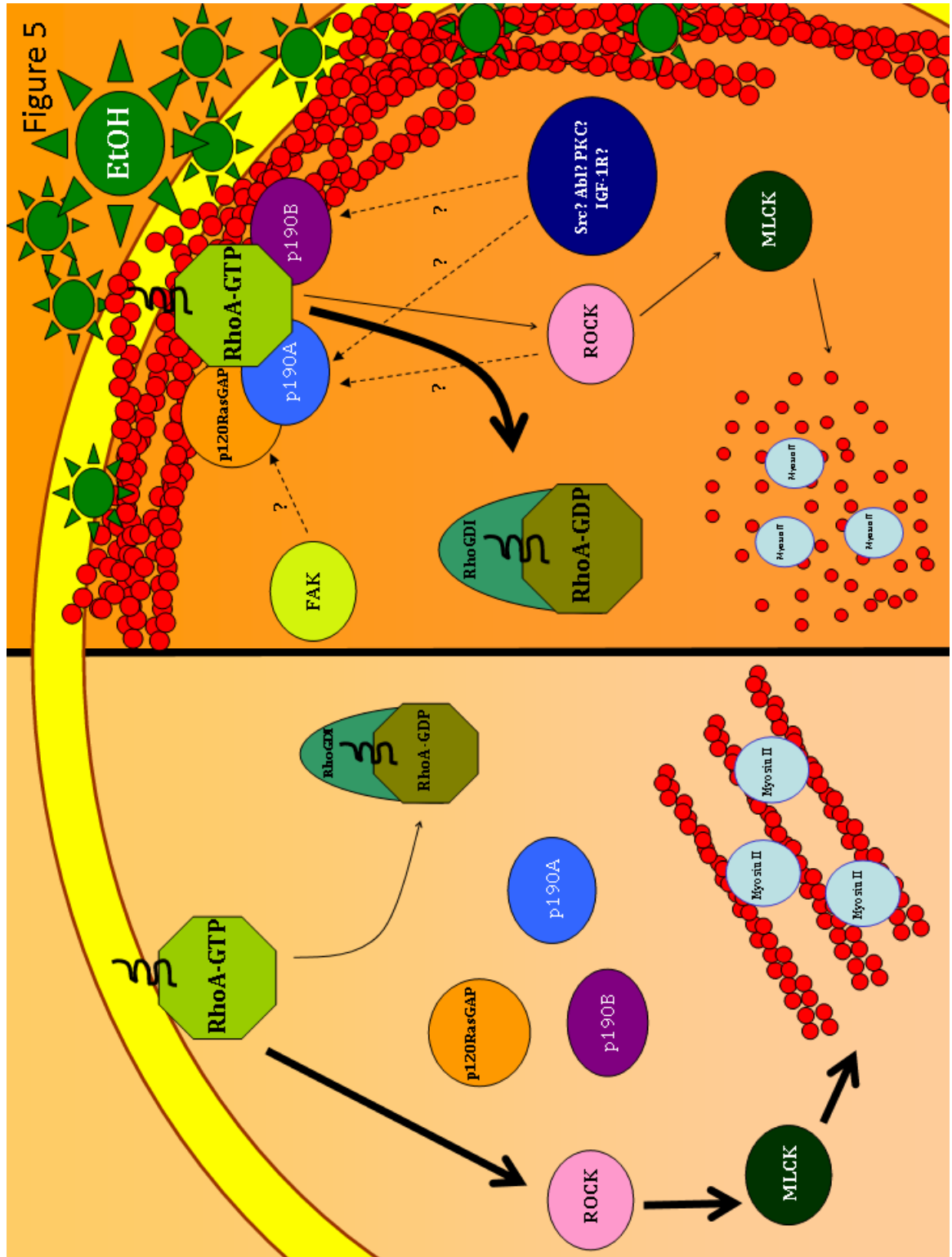


Figure 4



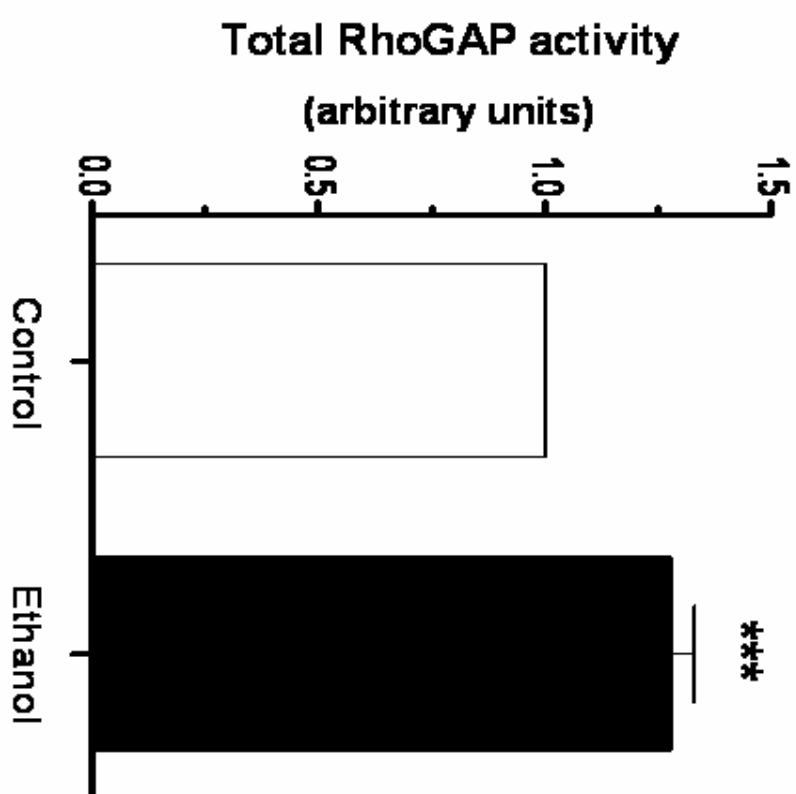
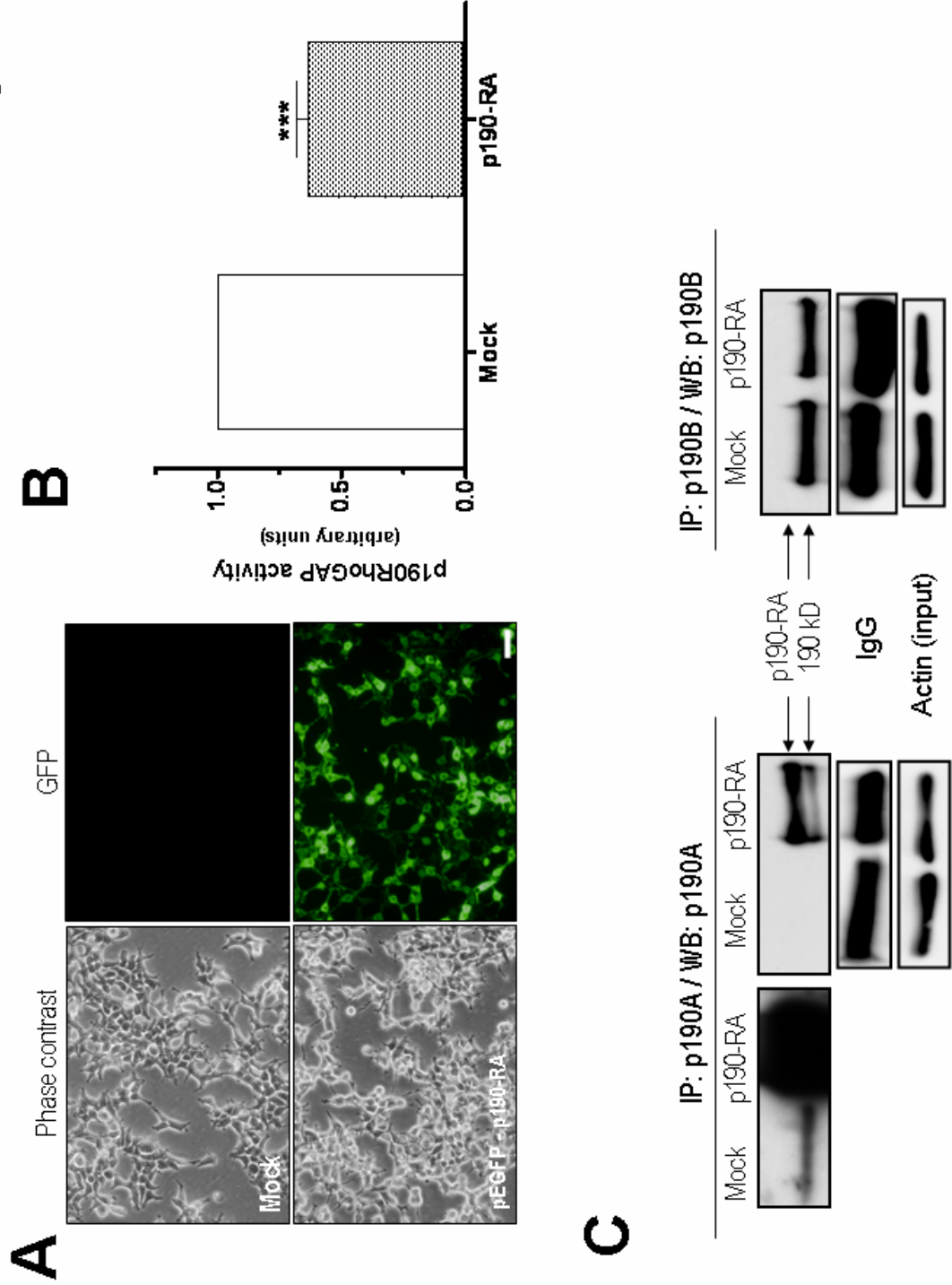


Figure S1

Figure S2



Data: Thu, 23 Sep 2010 09:20:05 -0400 [dj, 23 set 2010 15:20:05 CEST]

De: bmbnbn@bmb.leeds.ac.uk

Per a: jselva@ub.edu, gegea@ub.edu

Tema: Journal of Neurochemistry - Manuscript JNC-E-2010-1029

23-Sep-2010

Dear Co-Author,

This is an automatically generated email to inform you that a manuscript entitled "Ethanol increases p190RhoGAP activity, leading to actin cytoskeleton rearrangements", on which you are an author, has been successfully submitted by the corresponding author to Journal of Neurochemistry online at: <http://mc.manuscriptcentral.com/jneurochem>

The reference number for your manuscript is: JNC-E-2010-1029.

This email is for your information only: all future communications from Journal of Neurochemistry will be addressed to the corresponding author only.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Neurochemistry. We hope you will submit future papers to the journal.

With best wishes.

Yours sincerely,

Editorial Office
Journal of Neurochemistry

TERCER TRABAJO: “Silver sub-nanoclusters electrocatalyze ethanol oxidation and provide protection against ethanol toxicity in cultured mammalian cells.”

Journal of the American Chemical Society
(2010; 132: 6947-6954)

OBJETIVO 2. - Evaluar la potencial aplicación biomédica de herramientas nanotecnológicas en modelos celulares expuestos a etanol

La idea de realizar este estudio surgió cuando el Dr. López-Quintela (Universidad de Santiago de Compostela, USC) nos comentó que su grupo había conseguido sintetizar agrupaciones de 2 o 3 átomos de plata (AgAQC) y que tenían la particularidad, entre otras, de electrocatalizar la oxidación del etanol. Debido a nuestro interés por encontrar las dianas moleculares del etanol y posibles agentes citoprotectores, nos planteamos la hipótesis de que los AgAQC fueran capaces de metabolizar el etanol y mitigar sus efectos tóxicos en las células en cultivo expuestas a etanol. Primero, pusimos a punto un modelo de exposición aguda al etanol con distintos tipos celulares y de entre ellos escogimos las células NRK. Seguidamente, evaluamos el daño celular analizando la morfología celular, la organización del citoesqueleto de actina y la apoptosis. Posteriormente, determinamos la citotoxicidad de los AgAQC en las células y las concentraciones de uso ideales. Nuestros resultados indican que los AgAQC son capaces de prevenir significativamente los efectos citotóxicos del etanol tanto en células NRK como en astrocitos. Este efecto era específico para alcoholes primarios pero no para otros agentes citotóxicos como el H₂O₂. Los AgAQC son capaces de disminuir la concentración de etanol en el medio solamente si las células están presentes. Esto último junto con otros datos electrocatalíticos aportados por el grupo del Dr. Quintela, indican que la electrocatálisis del alcohol por los AgAQC se daba a potenciales compatibles con los descritos en las células de mamífero. Ello sugiere que los AgAQC emplean el potencial de la membrana plasmática celular para llevar a cabo la electrooxidación del etanol.

J | A | C | S

A R T I C L E S

Published on Web 03/10/2010

Silver Sub-nanoclusters Electrocatalyze Ethanol Oxidation and Provide Protection against Ethanol Toxicity in Cultured Mammalian Cells

Javier Selva,[†] Susana E. Martínez,^{†,§} David Buceta,[‡] María J. Rodríguez-Vázquez,[‡] M. Carmen Blanco,[‡] M. Arturo López-Quintela,^{*,†} and Gustavo Egea[†]

Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Instituts d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) i de Nanociències i Nanotecnologia (IN²UB), Universitat de Barcelona, E-08036 Barcelona, Spain, and Laboratorio de Magnetismo y Nanotecnología (Nanomag), Instituto de Investigación Tecnológica, Universidad de Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

Received September 19, 2009; E-mail: malopez.quintela@usc.es

Abstract: Silver atomic quantum clusters (AgAQC)s, with two or three silver atoms, show electrocatalytic activities that are not found in nanoparticles or in bulk silver. AgAQC)s supported on glassy carbon electrodes oxidize ethanol and other alcohols in macroscopic electrochemical cells in acidic and basic media. This electrocatalysis occurs at very low potentials (from $\sim +200$ mV vs RHE), at physiological pH, and at ethanol concentrations that are found in alcoholic patients. When mammalian cells are co-exposed to ethanol and AgAQC)s, alcohol-induced alterations such as rounded cell morphology, disorganization of the actin cytoskeleton, and activation of caspase-3 are all prevented. This cytoprotective effect of AgAQC)s is also observed in primary cultures of newborn rat astrocytes exposed to ethanol, which is a cellular model of fetal alcohol syndrome. AgAQC)s oxidize ethanol from the culture medium only when ethanol and AgAQC)s are added to cells simultaneously, which suggests that cytoprotection by AgAQC)s is provided by the ethanol electro-oxidation mediated by the combined action of AgAQC)s and cells. Overall, these findings not only show that AgAQC)s are efficient electrocatalysts at physiological pH and prevent ethanol toxicity in cultured mammalian cells, but also suggest that AgAQC)s could be used to modify redox reactions and in this way promote or inhibit biological reactions.

1. Introduction

Electrochemistry mediated by small metal nanoparticles is a recent, very active and promising field with enormous possibilities, many of which remain unexplored.¹ Molecule-like energy HOMO–LUMO (the highest occupied molecular orbital to the lowest unoccupied molecular orbital) gaps are created in nanoparticles with <100 atoms, which are called atomic clusters. The existence of these band gaps together with geometrical or electronic closed-shell structures² confers novel properties to atomic clusters^{3–6} as well as an unexpected extremely high

stability.^{7–9} For example, we have recently reported the fluorescent¹⁰ and paramagnetic¹¹ properties of very stable Ag_n ($n < 10$) clusters and the excellent electrocatalytic properties shown by Au_n ($n \approx 3–11$) clusters for the oxygen reduction reaction.¹² As we will show later on, we also observe that silver atomic quantum clusters (AgAQC)s containing only 2 or 3 atoms are very active electrocatalysts in the oxidation of alcohols, and this occurs at very low potentials. On the basis of these properties, we hypothesized that electrocatalysis by AgAQC)s for ethanol oxidation reaction is possible whenever cells provide the required electrical potential for the electrochemical oxidation reaction. In this case, AgAQC)s could prevent (or at least mitigate) some cellular injuries produced by ethanol. This is relevant in the case of fetal alcohol syndrome (FAS), a common pathology in children of women who consumed alcohol

[†] University of Barcelona.

[‡] University of Santiago de Compostela.

[§] Present address: IMIM-Hospital del Mar, Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona, E-08003 Barcelona, Spain.

- (1) Murray, R. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2688.
- (2) Negishi, Y.; Chaki, N. K.; Shichibu, Y.; Whetten, R. L.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11322.
- (3) Heaven, M. W.; Dass, A.; White, P. S.; Holt, K. M.; Murray, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3754.
- (4) Negishi, Y.; Takasugi, Y.; Sato, S.; Yao, H.; Kimura, K.; Tsukuda, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6518.
- (5) Schaeffer, N.; Tan, B.; Dickinson, C.; Rosseinsky, M. J.; Laromaine, A.; McComb, D. W.; Stevens, M. M.; Wang, Y.; Petit, L.; Barentin, C.; Spiller, D. G.; Cooper, A. I.; Levy, R. *Chem. Commun.* **2008**, *34*, 3986.
- (6) Herzog, A. A.; Kieley, C. J.; Carley, A. F.; Hutchings, P. L. G. *J. Science* **2008**, *321*, 1331.

- (7) Duan, H.; Nie, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2412.
- (8) Li, J.; Li, X.; Zhai, H.-J.; Wang, L.-S. *Science* **2003**, *299*, 864.
- (9) Shichibu, Y.; Negishi, Y.; Tsunoyama, H.; Kanehara, M.; Teranishi, T.; Tsukuda, T. *Small* **2007**, *3*, 835.
- (10) Ledo, A.; Martínez, F.; López-Quintela, M. A.; Rivas, J. *Physica B* **2007**, *398*, 273.
- (11) Ledo-Suarez, A.; Rivas, J.; Rodríguez-Abreu, C. F.; Rodríguez, M. J.; Pastor, E.; Hernández-Creus, A.; Osseroff, S. B.; López-Quintela, M. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8823.
- (12) Rodríguez-Vázquez, M. J.; Blanco, M. C.; Lourido, R.; Vázquez-Vázquez, C.; Pastor, E.; Planes, G. A.; Rivas, J.; López-Quintela, M. A. *Langmuir* **2008**, *24*, 12690.

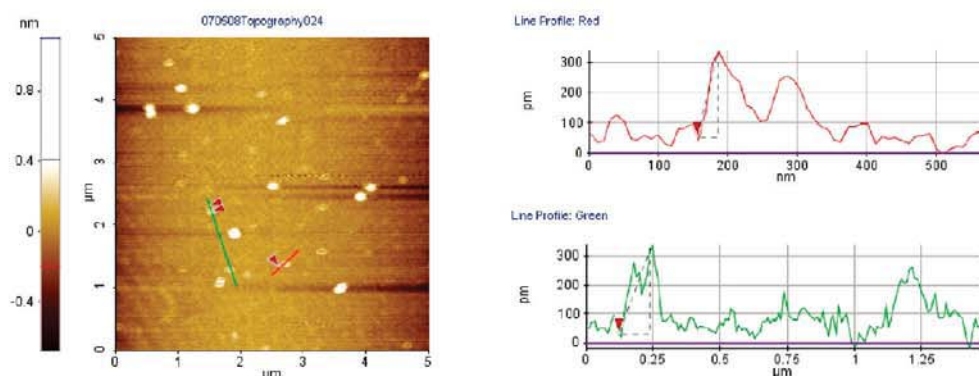


Figure 1. (Left) AFM picture of AgAQC deposited on mica (mean square roughness ~ 150 pm). (Right) Profiles throughout the red and green lines depicted on the AFM picture.

during pregnancy.¹³ It is important to highlight that the development of the nervous system is particularly sensitive to alcohol, which can finally lead to severe dysfunctions.¹³ In this respect, it has been reported that ethanol induces, among other effects, apoptosis¹⁴ and actin cytoskeleton rearrangements^{15,16} in primary cultures of newborn rat astrocytes, which is a well-established cellular model of FAS.¹³

Here, we show that AgAQC are cytoprotective against ethanol, which is revealed by the prevention of actin cytoskeleton rearrangements and apoptosis caused by ethanol exposure. We hypothesize that the possible correlation between the electrocatalytic and cytoprotective properties of AgAQC follows the well-known role played by enzymes in fuel cell technologies. A great interest in the use of enzymes instead of metals as electrocatalysts in fuel cell reactions has recently emerged in this field.¹⁷ However, to the best of our knowledge, the application of metals as electrocatalysts for changing biological reaction rates has not been explored so far. Our *in vivo* and *in vitro* experiments, showing that AgAQC are effective electrocatalysts for electro-oxidation of different alcohols in both media, demonstrate that the connection between electrochemical and biological cells may be much deeper than it has been thought up until now.¹⁷

Thus, we provide experimental evidence that (1) AgAQC supported on glassy carbon electrodes electrocatalyze the oxidation of ethanol in macroscopic electrochemical cells in acidic and basic media at voltages near 0 V vs the reference hydrogen electrode (RHE), at very low potentials in a physiological medium (PBS) and pH, and at ethanol concentrations found in alcoholic patients; (2) AgAQC prevent ethanol-induced alterations in normal rat kidney (NRK) cells and primary cultures of newborn rat astrocytes; (3) AgAQC reduce the ethanol concentration present in the culture medium of cultured cells; and (4) AgAQC electro-oxidize and prevent the toxicity induced by other alcohols such as methanol and butanol, but not other stress-induced agents such as H_2O_2 . Finally, we

suggest a mechanism for electrocatalysis of the ethanol oxidation by AgAQC in cultured mammalian cells.

2. Experimental Section

Antibodies and Reagents. Polyclonal anti-actin antibody was purchased from Cytoskeleton (Denver, CO). Polyclonal anti-caspase-3 and anti-cleaved caspase-3 antibodies were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA). Monoclonal anti- α -tubulin antibody was from Sigma-Aldrich. Secondary goat anti-rabbit and goat anti-mouse IgG HRP antibodies were from Promega (Eugene, OR). Cyanine-3 (Cy3)-conjugated rabbit, Cy3-conjugated mouse, and Cy2-conjugated mouse secondary antibodies were from Jackson Laboratories (CSH, USA). Cell culture media were obtained from Gibco BRL Life Technologies (Paisley, Scotland, UK). Latrunculin B and DAPI were obtained from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Ethanol, methanol, butanol, and H_2O_2 were from Merck (Nottingham, UK). Staurosporine, TRITC-phalloidin, FITC-phalloidin, yeast alcohol dehydrogenase, NAD^+ , and the other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich. All chemicals were of reagent grade, purchased from Fluka and used as received. Solutions were prepared with deionized water (Milli-Q, Millipore Corp). Silver clusters (NGAP-AQC-Ag01) dispersed in aqueous solution, mainly composed of Ag_2L and Ag_3L ($L = OH^-$, O_2 , and/or H_2O) clusters at a concentration of 1 mg/L, were purchased from Nanogap Co. (Santiago de Compostela, Spain, www.nanogap.es). Ag clusters were used as provided, without further purification.

Other Experimental Procedures. See Supporting Information

3. Results and Discussion

3.1. AgAQC Catalyze the Electro-oxidation of Ethanol at Very Low Potentials. We first checked the size and stability of AgAQC. Atomic force microscopy (AFM) measurements of clusters deposited on a mica surface confirmed the presence of very small clusters ~ 0.3 nm high, i.e., 1 atom high (Figure 1). This meant that Ag clusters should contain less than ~ 6 – 7 atoms, because clusters of this size have a 2D flat structure.¹⁸

Ag clusters are very stable in water dispersions (for up to several months), displaying a continuous increase of spectral absorption in the UV region with decreasing wavelength and showing some resolved peaks (Figure S1, Supporting Information), which is characteristic of very small clusters.¹² An estimation of the cluster size assuming the spherical Jellium model (which seems to be acceptable even for very small

(13) Martínez, S. E.; Egea, G. *Recent Pat. CNS Drug Discovery* **2007**, *2*, 23.

(14) Miñambres, R.; Guasch, R. M.; Perez-Aragó, A.; Guerri, C. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 271.

(15) Tomás, M.; Marín, P.; Megías, L.; Egea, G.; Renau-Piqueras, J. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 773.

(16) Martínez, S. E.; Lázaro-Dieguez, F.; Selva, J.; Calvo, F.; Piqueras, J. R.; Crespo, P.; Claro, E.; Egea, G. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1044.

(17) Cracknell, J. A.; Vincent, K. A.; Armstrong, F. A. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439.

(18) Lee, H. M.; Ge, M.; Sahu, B. R.; Tarakeshwar, P.; Kim, K. S. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9994.

clusters)¹⁹ from the beginning of the absorption bands (~ 350 nm = 3.54 eV) gives a size of ~ 3 atoms ($n = (5.4/3.54)^3$, where 5.4 eV is the Fermi level of bulk silver), which in turn is consistent with the data supplied by the supplier. We also confirmed that AgAQCs are very stable in the potential range from -0.8 to $+0.7$ V vs RHE (data not shown). The high stability of these small clusters is probably associated with their large HOMO–LUMO bandgaps ($> \sim 3.5$ eV), which renders them very difficult to reduce or oxidize, and also with their strong electronic shell closure ($1S^2$) predicted for delocalized “superatomic orbitals”.²⁰

Next, we examined the electrocatalytic properties of AgAQCc. To this aim, we tested the oxidation of ethanol. Linear sweep voltammograms (LSVs) from -200 to $+300$ mV vs RHE were recorded using a modified glassy carbon (GC) electrode containing silver clusters. This particular range of low potentials was chosen because this is the range of interest for the electrocatalytic applications of clusters in biological cells. The amount of clusters used was calculated to achieve approximately a monolayer of Ag clusters deposited onto the GC electrodes. LSVs were carried out first in a blank solution (acid medium, 1 M H_2SO_4 , or basic medium, 1 M NaOH) and then in the same solution but containing different ethanol concentrations. Oxidation of ethanol occurred in both acidic and basic media (Figure 2A,B, respectively). AgAQCc required very low potentials to promote electrocatalysis (voltages close to 0 V vs RHE; Figure 2A). Similar results were obtained using electrodes covered with Nafion (data not shown), which indicates that AgAQCc are stable on the bare GC electrode surface within the explored potential range. The higher anodic currents detected in the basic solution are consistent with the observation that, in a basic medium, the adsorption of spectator anions on silver decreases, thus hindering ethanol oxidation (Figure 2B).²¹

Since the initial electrocatalytic results were obtained in strong acidic and basic media, we next examined whether AgAQCc are also able to oxidize ethanol in physiological conditions. For this purpose we used phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Moreover, we sought to identify the range of current densities in which the electrocatalysis occurs in the oxidation of the ethanol at concentrations that are usually found in blood of alcoholic individuals.²² Interestingly, the electro-oxidation of ethanol (at 20, 100, and 500 mM) in PBS took place at $+0.2$ V vs RHE (Figure 2C).

The nonlinear dependence on the current density of the ethanol concentration at these low potentials ($< \sim 0.3$ V) indicates that the electro-oxidation of ethanol does not occur under diffusive control but by the applied potential, which in turn is also supported by the voltammetric dependences on the scan rate (see Figure S2A,B, Supporting Information). Similar behavior is found in the glucose oxidation by enzymes attached to carbon electrodes under the same range of potential.²³ Moreover, the observed current densities ($\approx \mu A/cm^2$) for ethanol

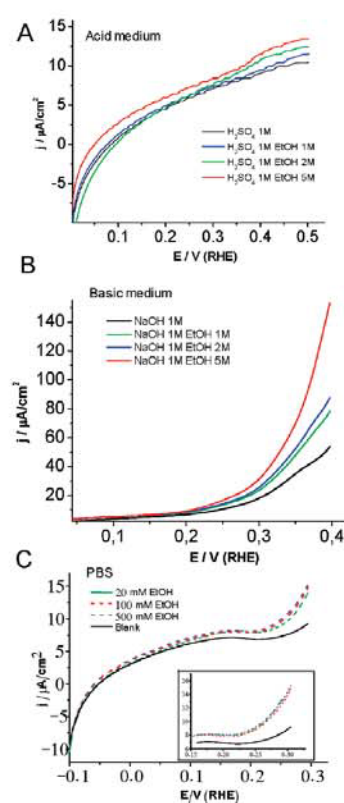


Figure 2. Electrocatalysis of the oxidation of ethanol by AgAQCc. Linear sweep voltammograms at different concentrations in acid (H_2SO_4 , A), base (NaOH, B), or physiological medium (PBS, C). All potentials are referred to the reference hydrogen electrode (RHE). Sweep rate, 50 mV s^{-1} .

are of the same order of magnitude of those reported for electro-oxidation reactions carried out on enzymatically modified electrodes.¹⁷ The reaction products and exact pathway by which ethanol electro-oxidation takes place with Ag clusters at these low overpotentials are at the moment not known, but the catalytic activity could be related to their ability to interact with oxygen-containing species.²⁴ The observed catalytic activity displayed by AgAQCc can be compared with that of other biological and nonbiological catalysts under similar experimental conditions. Thus, the estimated catalytic activity of AgAQCc in acidic medium and 0.5 V is 0.15 mA/cm²·mg of Ag. This catalytic activity is ~ 100 times higher than that observed for Pt, and half that of Pt₈₀Ru₂₀.²⁵ Comparison with other enzymes, such as alcohol dehydrogenase (ADH) and its co-enzyme nicotinamide adenine dinucleotide ($NAD^+/NADH$), is more difficult due to the wide dispersion of reported values. For example, the activity of AgAQCc at physiological pH and 0.2 V is approximately of the same order of magnitude as that

(19) Zheng, J.; Zhang, C.; Dickson, R. M. *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 077402.

(20) Walter, M.; Akola, J.; Lopez-Acevedo, O.; Jadzinsky, P. D.; Calero, G.; Ackerson, C. J.; Whetten, R. L.; Grönbeck, H.; Häkkinen, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 9161.

(21) Spindelov, J. S.; Wieckowski, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 2654.

(22) Eckardt, M. J.; File, S. E.; Gessa, G. L.; Grant, K. A.; Guerri, C.; Hoffman, P. L.; Kalant, H.; Koob, G. F.; Li, T.-K.; Tabakoff, B. *Alcohol: Clin. Exp. Res.* **1998**, *22*, 998.

(23) Kamitaka, Y.; Tsujimura, S.; Setoyama, N.; Kijino, T.; Kano, K. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2007**, *9*, 1793.

(24) Hagen, J.; Socaciu, L. D.; Roux, J. L.; Popolan, D.; Bernhardt, T. M.; Woste, L.; Mitric, R.; Nolak, H.; Bonacic-Koutecki, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 3442.

(25) Chatterjee, M.; Chatterjee, A.; Ghosh, S.; Basumallick, I. *Electrochim. Acta* **2009**, *54*, 7299.

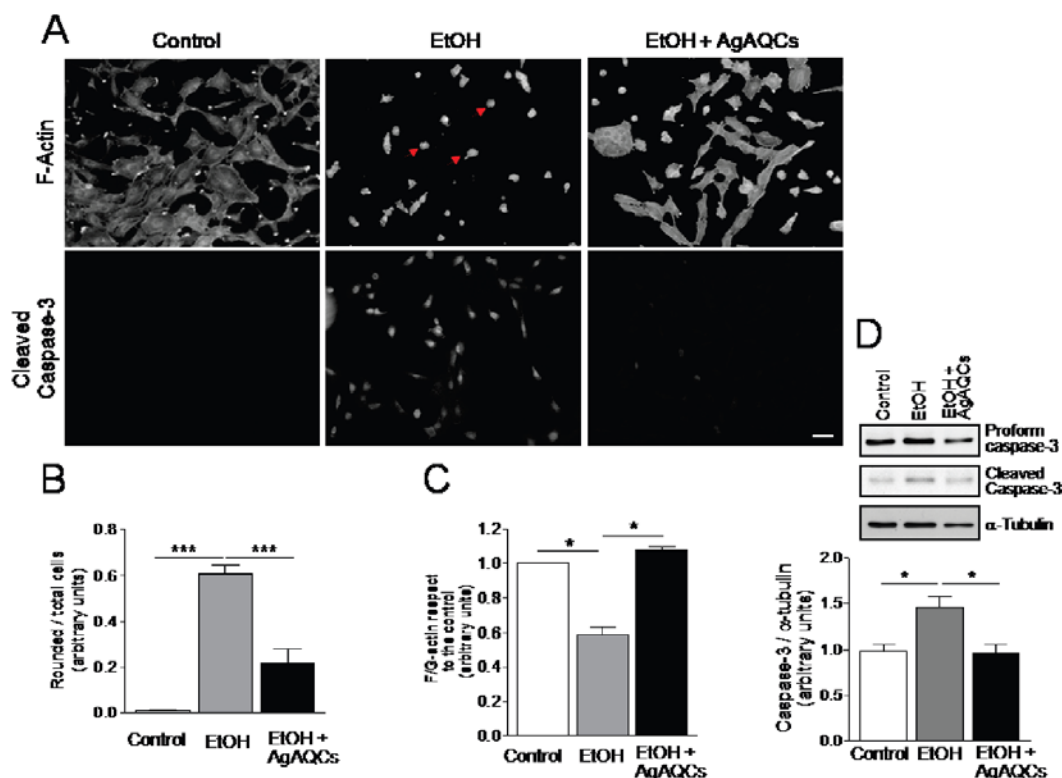


Figure 3. AgAQC prevents ethanol-induced alterations in the cellular morphology and the actin cytoskeleton organization. (A) Ethanol-exposed cells (200 mM) were incubated in the absence or in the presence of AgAQC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min. The cell shape and the actin cytoskeleton organization (F-actin) were evaluated under the epifluorescence microscope using FITC-phalloidin. Activation of apoptosis was also evaluated using immunofluorescence by the presence of cleaved caspase-3 in the cell nucleus. Scale bar, 20 μm . (B) Quantitative analysis of results shown in panel A. Statistical significance according to one-way ANOVA, (***) $p \leq 0.001$. (C) Globular (G) and filamentous (F) actin pools from unexposed (control) or ethanol-exposed cells in the absence (EtOH) or in the presence of AgAQC (EtOH + AgAQC), were analyzed by immunoblotting using anti-actin antibodies (see a representative experiment in Figure S4, Supporting Information). Statistical significance according to the Student's *t* test, (*) $p \leq 0.05$. (D) Immunoblot analysis of unexposed (control) and ethanol-exposed cells incubated in the absence (EtOH) or in the presence of AgAQC (EtOH + AgAQC). Caspase-3 activation was detected using antibodies against caspase-3 fragments (19 and 17 kDa; see also Figure S5B, Supporting Information). α -Tubulin was used as a loading control. Bars represent the ratio between positive apoptotic cells with respect to total cells. Statistical significance according to one-way ANOVA, (*) $p \leq 0.05$.

reported by Minter's group,²⁶ but 3 orders of magnitude lower than that reported by Gouveia-Caridade et al.²⁷

3.2. AgAQC Prevents Ethanol-Induced Alterations in Cultured Mammalian Cells. Since AgAQC electrocatalyzes *in vitro* the oxidation of ethanol at very low potentials and in a physiological medium, we explored whether AgAQC could prevent or mitigate some well-known cellular alterations that are observed in cells exposed to ethanol. Our previous studies in primary cultures of rat astrocytes showed that long-term ethanol exposure (chronic treatment) perturbs the organization of the actin cytoskeleton, which is visualized by a decrease of actin stress fibers and the formation of peripheral actin rings.^{15,16} However, in this present work we had to establish another cellular model to evaluate first the cytotoxicity and then the subcellular alterations induced by ethanol at shorter periods of time (acute treatment). In a variety of clonal cell lines, we evaluated three parameters which are representative of the acute ethanol toxicity: (1) the appearance of a rounded cell shape as a consequence of the abnormal rearrangement of the actin

cytoskeleton, (2) alterations in the ratio between filamentous (F-actin) and globular (G-actin) actin, and (3) the induction of apoptosis. We finally chose NRK cells because of their higher sensitivity to ethanol exposure (200 mM, 30 min; Figures S3–S5, Supporting Information), as well as tolerance to AgAQC concentrations up to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~0.3 mM) (Figures S6 and S7, Supporting Information). Next, we tested the potential cytoprotective effect of AgAQC. Thus, NRK cells were exposed to ethanol (200 mM) in the presence or absence of AgAQC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 3 and Figure S8, Supporting Information).

Ethanol significantly increased the number of cells that presented a rounded morphology (red arrows) and a disorganized actin cytoskeleton (Figures 3A,B and S4). In contrast, in the presence of AgAQC, the number of ethanol-induced rounded cells decreased (Figures 3A,B and S8), and most exhibited a normal actin organization (Figure 3A). We also measured the ratio between F-actin and G-actin to evaluate the integrity of the actin cytoskeleton.²⁸ Ethanol significantly reduced the F-/G-actin ratio (Figures 3C and S4C,D), but importantly the total amount of actin remained unaltered (Figure S4D, INPUT). As

(26) Topcagic, S.; Minter, S. D. *Electrochim. Acta* 2006, 51, 2168.

(27) Gouveia-Caridade, C.; Pauliukaite, R.; Brett, C. M. A. *Electrochim. Acta* 2008, 53, 6732.

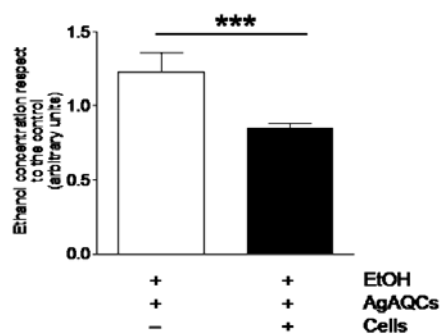


Figure 4. AgAQC decrease the concentration of ethanol in the culture medium only when cells are present. Determination of the ethanol concentration in the cell culture medium that contained ethanol (200 mM) and 1 $\mu\text{g/mL}$ AgAQC with (+) or without (-) NRK cells. Statistical significance according to the Student's *t* test, (***) $p \leq 0.001$.

expected, AgAQC prevented the ethanol-induced reduction of the F-/G-actin ratio (Figure 3C).

Since ethanol induces oxidative stress and cell death by apoptosis,^{29–31} we then explored whether AgAQC could also prevent it. The activation of caspase-3 is a key mediator and a well-established cellular marker of apoptosis in mammalian cells.^{30,32} The induction of apoptosis was examined by immunofluorescence and immunoblotting based on the formation and nuclear localization of proteolytic fragments of caspase-3. Cleaved caspase-3 appeared in the nucleus 30 min after the ethanol exposure (Figures 3A and S5A). Caspase-3 fragments were also resolved by immunoblotting (Figures 3D and S5B,C). When ethanol-exposed cells were incubated with AgAQC, both the proteolysis and the nuclear localization of caspase-3 were prevented (Figure 3A,D).

Therefore, our data showed that AgAQC prevent the cellular alterations produced by ethanol. Strikingly, this protection was obtained only when ethanol and AgAQC were both added simultaneously to cells. When one was added before the other, the cytoprotection was not produced (data not shown). This result indicates that cytoprotection by AgAQC against ethanol results from the combined action of sub-nanoclusters and cells (see below).

3.3. AgAQC Oxidize Ethanol Only in the Presence of Cells. Regarding the catalytic properties of AgAQC for the electro-oxidation of ethanol, we examined whether the cytoprotection mediated by AgAQC in NRK cells takes place by decreasing the ethanol present in the culture medium. To this aim, we measured the final ethanol concentration in the culture medium of cells exposed to ethanol (200 mM) in the absence and in the presence of AgAQC (1 $\mu\text{g/mL}$). As shown in Figure 4, ethanol significantly diminished in the culture medium when AgAQC were present.

Interestingly, this decrease was produced only when the culture medium was in contact with cells, which is in accordance with the observation that the prevention mediated by AgAQC against the reported ethanol-induced alterations occurred only

when ethanol and AgAQC were both added to cells simultaneously. Therefore, our data suggest that AgAQC need the presence of cells to be cytoprotective.

3.4. AgAQC Are Also Cytoprotective in Rat Astrocytes. The protection by AgAQC against ethanol toxicity in cells expands its conceivable application in the etiopathogenesis of alcohol abuse. Ethanol is a teratogen that affects the development of the nervous system, where both neurons and glial cells are perturbed.^{13,31} Among other alterations, ethanol disorganizes the actin cytoskeleton in primary cultures of rat astrocytes.^{15,16} Therefore, we examined whether AgAQC could protect newborn rat astrocytes from the effects of acute ethanol exposure. Thus, changes in the cell shape and in the actin cytoskeleton organization were examined. However, to produce these alterations in rat astrocytes, it is necessary to use a higher ethanol concentration than for NRK cells (500 vs 200 mM, respectively). Thus, primary cultures of rat astrocytes were incubated with AgAQC at 0.5 (data not shown) or 1 $\mu\text{g/mL}$ for 30 min (Figure 5). At both AgAQC concentrations, cells showed no alteration either in the cell shape or in the actin cytoskeleton organization. As expected, ethanol induced alterations in the cell shape and in the actin cytoskeleton organization, but alterations of both were significantly prevented when astrocytes were co-incubated with AgAQC (Figure 5). These results indicate that, as in NRK cells, AgAQC are also cytoprotective for astrocytes exposed to ethanol.

3.5. AgAQC Prevent Alterations Induced by Other Alcohols but Not Those Caused by H_2O_2 . We next explored whether AgAQC also protect cells from harmful effects triggered by other alcohols such as methanol or butanol as well as the catalytic properties of AgAQC for the electro-oxidation of these other alcohols (Figure 6).

NRK cells were exposed to methanol (50 mM) or butanol (25 mM) for 30 min, and the cell shape and the organization of the actin cytoskeleton were analyzed. Both alcohols induced similar actin cytoskeleton rearrangements like those produced by ethanol with the concomitant change in the cell morphology (Figure 6A). These results are in accordance with previous data obtained in other cell lines.³³ The number of methanol- or butanol-exposed cells with a rounded morphology and altered actin cytoskeleton significantly decreased when cells were co-incubated with the respective alcohol and AgAQC (Figure 6A and B). Therefore, the protective effect of AgAQC is not restricted to ethanol, but it also occurs for other primary alcohols.

We next examined whether AgAQC are cytoprotective against toxic agents other than alcohols. To this aim, we used hydrogen peroxide (H_2O_2), which like ethanol also induces oxidative stress.³⁴ NRK cells exposed to H_2O_2 (250 μM for 30 min) produced severe changes in both the actin cytoskeleton organization and the cell shape, neither of which was prevented by AgAQC (Figure 7A,B).

Interestingly, electro-oxidation of methanol and butanol also occurred in acidic and basic media (data not show) as well as in PBS at the same low potentials, $\leq +200$ mV registered for ethanol (compare Figures 2C and 6C,D). In contrast, electroreduction of H_2O_2 in acidic medium or in PBS occurred at much more negative potentials (Figure 7C,D). In acidic medium (Figure 7C), electro-reduction occurred from -0.6 V, a similar value to that obtained in the curve of H_2O_2 in N_2 after the O_2

(28) Lázaro-Diéguez, F.; Aguado, C.; Mato, E.; Sánchez-Ruiz, Y.; Esteban, I.; Alberch, J.; Knecht, E.; Egea, G. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1415.

(29) Zhou, Z.; Sun, X.; Kang, Y. *J. Am. J. Pathol.* **2001**, *159*, 329.

(30) Ieraci, A.; Herrera, D. G. *PLoS Med.* **2006**, *3*, 0547.

(31) Harper, C. *Hum. Exp. Toxicol.* **2007**, *26*, 251.

(32) Köhler, C.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. *J. Immunol. Methods* **2002**, *265*, 97.

(33) Komati, H.; Naro, F.; Mebarek, S.; De Arcangelis, V.; Adamo, S.; Lagarde, M.; Prigent, A. F.; Némoz, G. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 1232.

(34) Han, D.; Hanawa, N.; Saberi, B.; Kaplowitz, N. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 627.

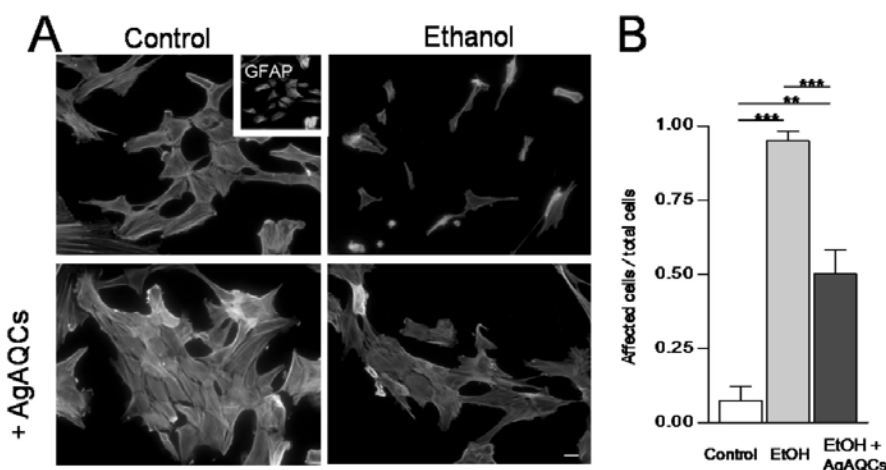


Figure 5. AgAQC prevents the deleterious effects induced by ethanol in primary cultures of rat astrocytes. (A) Unexposed (control) and ethanol (500 mM)-exposed astrocytes were incubated with AgAQC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min and stained with FITC-phalloidin. Immunostaining with glial fibrillar acidic protein (GFAP) antibodies identified astrocytes (inset in panel A). Scale bar, 20 μm . (B) Quantitative analysis of the results shown in panel A, in which we determined the ratio of ethanol-affected cells with respect to total cells (immunostained for GFAP). Statistical significance according to the Student's *t* test, (***) $p \leq 0.01$ and (****) $p \leq 0.001$.

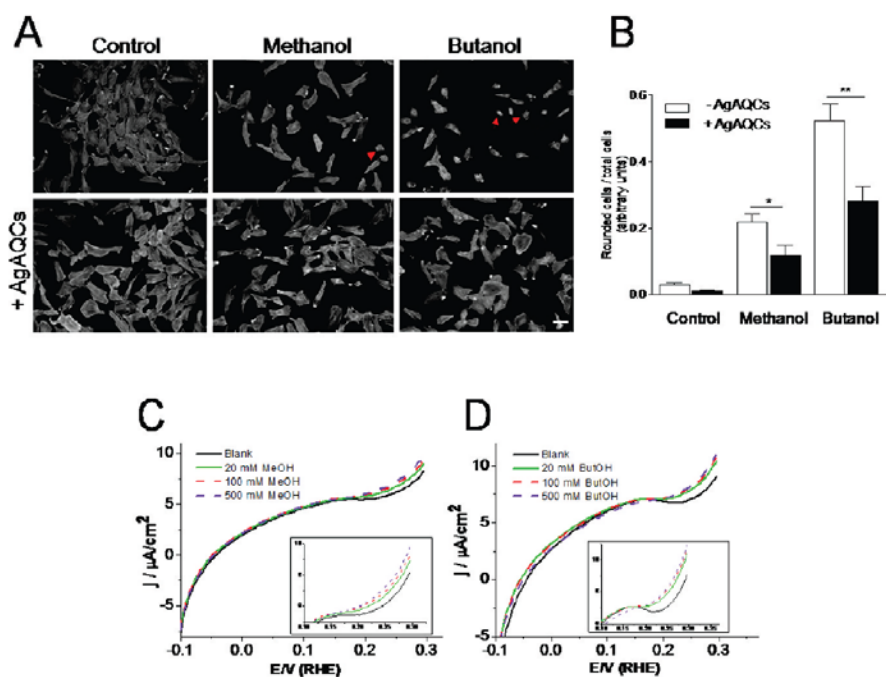


Figure 6. AgAQC also protects cells against methanol or butanol exposure. (A) Unexposed cells (control) and cells exposed to methanol (50 mM) or butanol (25 mM) were incubated in the absence or in the presence of AgAQC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min. Actin cytoskeleton was visualized using FITC-phalloidin. Scale bar, 20 μm . (B) Quantitative analysis of the results shown in panel A. The ratio of altered cells (red arrowheads in panel A) with respect to total cells is indicated. Statistical significance according to one-way ANOVA, (*) $p \leq 0.05$ and (**) $p \leq 0.01$. (C,D) Voltammograms of the oxidation at AgAQC/GC electrode at a sweep rate of 50 mV s^{-1} of 20, 100, and 500 mM methanol and butanol in PBS.

elimination. In contrast, electro-reduction of H_2O_2 in PBS (Figure 7D) showed two well-defined steps when both H_2O_2 and O_2 were present. The first sharp electrocatalytic current peak (peak 1) corresponds to O_2 and the second one (peak 2) to H_2O_2 reduction. The latter in PBS was much less favorable than in acidic medium, where the current decreased 2 orders of

magnitude and the reduction peak was shifted to more negative potentials (~ -0.9 V in PBS vs -0.6 V in acidic medium).

3.6. Potential Mechanisms for Ethanol Electrocatalysis by AgAQC in Cultured Mammalian Cells. Our results show that deleterious effects of ethanol in culture cells can be prevented by AgAQC, which promote a decrease in the ethanol concen-

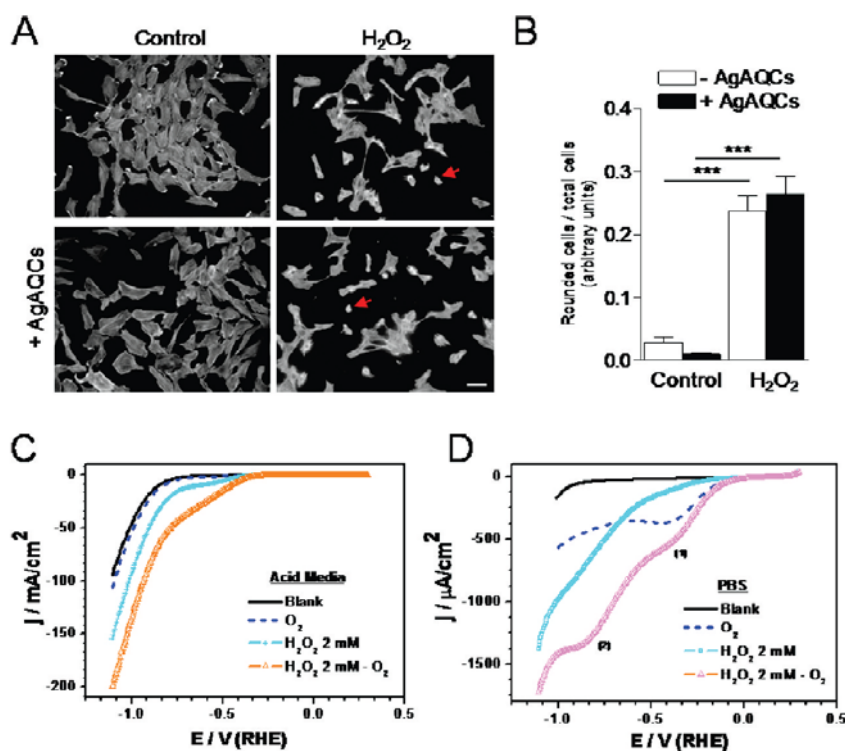


Figure 7. AgAQC do not protect cells against H_2O_2 . (A) Unexposed (control) and H_2O_2 (250 μM)-exposed NRK cells were incubated with AgAQC (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min. The actin cytoskeleton was visualized using FITC-phalloidin. Red arrows show some representative rounded cells caused by H_2O_2 . Scale bar, 20 μm . (B) Quantitative analysis of the results shown in panel A. Statistical significance according to one-way ANOVA, (***) $p \leq 0.001$. (C,D) Forward reductive sweeps of cyclic voltammograms showing the H_2O_2 electrocatalysis in a AgAQC/GC electrode at a sweep rate of 50 mV s^{-1} with or without H_2O_2 in either acidic medium (C) or PBS (D) in N_2 atmosphere without H_2O_2 (black line), in N_2 atmosphere with 2 mM H_2O_2 (turquoise line), or in O_2 atmosphere with 2 mM H_2O_2 (orange line). For identification of peaks (1 and 2) in PBS, another sweep in O_2 atmosphere without H_2O_2 (blue dotted line) was added in panel D.

tration present in the culture medium. Since this decrease takes place only when ethanol, AgAQC, and cells are all present in the assay, it is reasonable to hypothesize that cell membranes have to be the suppliers of the electrical potential required by AgAQC to mediate their prevention. The observation that, under physiological conditions, AgAQC electrocatalyze ethanol oxidation at a potential and current densities of the same order of magnitude of those measured in the plasma membrane in excitable and non-excitable cells seems to support such a hypothesis.³⁵ Moreover, notice that both parameters (membrane potentials and current densities) are of the same order of magnitude as those reported for electrochemical events measured in other organelles, such as mitochondria.³⁶

AgAQC are planar structures¹⁸ that tend to attach to interfaces of model membranes like surfactant films in microemulsions.^{10,11} Therefore, it is reasonable to hypothesize that the association of Ag clusters with the plasma membrane could provide suitable conditions for the electrocatalysis of ethanol oxidation. We were unable to provide any direct evidence for the uptake and subcellular localization of AgAQC in cells because they are too small to be resolved by conventional electron microscopy for biological samples. In addition,

although AgAQC emit fluorescence,¹⁰ their low emission wavelengths and low concentration used in our study did not allow us to detect them either in cells or in the culture medium.

As can be seen, the minimum potential for ethanol oxidation in PBS (minimum free energy to drive the reaction) is +200 mV. Therefore, by comparison of the same electrocatalytic reaction in the electrochemical and NRK cells, it is possible to estimate the minimum potential (minimum free energy) to drive the reaction at the cell membrane side (outer/inner) where electrocatalysis could take place. From the observation that electro-oxidation of alcohols occurs in NRK cells, the value of the oxidative outer plasma hemimembrane potential in these cells should then be $\varphi_{\text{out}} \geq +200$ mV vs RHE. This value is larger than the effective redox potential of the oxidizing extracellular environment (~ 0 V vs RHE).³⁷ However, it has to be taken into account that the concept of effective redox potentials in cells is not well defined and represents only an average value that varies over a broad range and largely depends on the cell type, oxidative stress conditions, etc.³⁸ On the other hand, surface and dipole potentials cause the electrical membrane potential to deviate from the mean values of the intra-

(35) Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M. *Principles of Neural Science*, 4th ed.; McGraw-Hill: New York, 2000; pp 126–127.

(36) Bockris, J. O. M.; Reddy, A. K. N. *Modern Electrochemistry 2B*; Kluwer Academic: New York, 2000; p 1967.

(37) Moriarty-Craige, S. E.; Jones, D. P. *Annu. Rev. Nutr.* **2004**, *24*, 481.

(38) Grigory, G.; Martinovich, G. G.; Cherenkevich, S. N.; Sauer, H. *Eur. Biophys. J.* **2005**, *34*, 937.

and extracellular compartments.³⁹ From the value of the oxidative outer hemimembrane electrical potential estimated above, and taking into account the usual values for transmembrane potentials (φ_{trans}) measured in nonexcitable mammalian cells (from -30 to -90 mV),³⁵ one could then estimate the value of the reductive inner plasma hemimembrane potential, $\varphi_{\text{in}} = \varphi_{\text{out}} - \varphi_{\text{trans}} > +200 - 30$ (or -90) mV = $+170$ (or $+110$) mV. According to this estimation, the minimum potential required at physiological conditions for the reduction of H_2O_2 (-900 mV) is far from that provided by the less positive inner hemimembrane potential value ($\varphi_{\text{in}} = +110$ mV). Therefore, AgAQCs do not electrocatalyze the reduction of H_2O_2 in cells only because they cannot provide the required potential for leading the electrocatalytic reaction.

4. Conclusions

Herein we show that injuries produced by ethanol in cultured mammalian cells are prevented by AgAQC. AgAQC electrocatalyze the oxidation of ethanol under physiological conditions at very low potentials. The protection in mammalian cells provided by Ag clusters is observed only when ethanol,

AgAQC, and the cells are all present in the assay. We postulate that cells provide the electrical potential required by AgAQC to mediate their cytoprotective role against ethanol, which suggests that cells could act as true power sources for the electrocatalysis of biochemical reactions. Finally, the protection provided by AgAQC against ethanol in a cellular model of FAS (rat astrocytes exposed to ethanol) widens their potential use in the prevention of the effects of ethanol on the central nervous system.

Acknowledgment. G.E. dedicates this article to Alicia Gámez, Albert Vilalta, and Roque Pascual from Barcelona Acció Solidaria. This work is supported by projects BFU2006-00867, BFU2008-07182, MAT2008-06503/NAN, and NanoBioMed CONSOLIDER-INGENIO 2010-0012, and by the European Commission (Contract No. 037465-FLUOROMAG). We thank Maite Muñoz (University of Barcelona) for her technical support and Nuria Aliaga, Ernest Giralt, and Tom Jovin for critical reading of the manuscript.

Supporting Information Available: Experimental methods and supplementary figures. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA907988S

(39) Clarke, R. J. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, 89–90, 263.

**Silver sub-nano clusters electrocatalyze
ethanol oxidation and provide protection
against ethanol toxicity in cultured
mammalian cells**

*Javier Selva[†], Susana E. Martínez^{‡†}, David Buceta[‡], María J. Rodríguez-Vázquez[‡], M. Carmen
Blanco[‡], M. Arturo López-Quintela^{*‡} and Gustavo Egea[†].*

Supporting Information

1. Experimental procedures

AFM: AFM measurements were conducted in normal atmosphere at room temperature using a XE-100 instrument (Park Systems) in non-contact mode. Scanning tips were aluminum-coated silicon ACTA from Park Systems with a resonance frequency of 325 kHz. For AFM imaging, 10 μL of a very diluted sample was dropped onto a fresh mica sheet (SPI Supplies, Grade V-1 Muscovite), thoroughly washed with milli-Q water and dried under nitrogen flow.

UV - vis Spectra: UV - vis Spectra were measured with a Hewlett-Pack 8452A Diode - Array Spectralphotometer.

Electrocatalysis: Electrochemical experiments were performed with a potentiostat (Ecochemie Autolab PGSTAT 20 potentiostat) in a conventional three-electrode electrochemical cell, using glassy carbon GC ($\Phi = 3 \text{ mm}$, Sygradur) as working electrode, Pt wire as the auxiliary electrode and Ag/AgCl as the reference electrode. Before cluster deposition, the GC electrode surface was polished to mirror-like using diamond paste and aluminium oxide, then rinsed with water in ultrasonic bath and finally dried. The electro-catalyst used in this study was prepared by deposition of 20 μl of the AgAQC's solution ($\approx 1 \mu\text{mol}$) on the top of the GC surface. Linear sweep voltammograms (LSV) were carried out in degassed solutions of PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 and 2 mM KH_2PO_4 at pH 7.4), under N_2 atmosphere, at 25 °C. All potentials are referred to the reversible hydrogen electrode (RHE).

Ethanol determination: Ethanol concentration in culture medium was performed by an enzymatic oxidation method using the yeast alcohol dehydrogenase (ADH) as

enzyme and NAD⁺ as cofactor of the reaction. Ethanol, the substrate of the reaction, was present in the culture medium. ADH oxidized ethanol by converting NAD⁺ to NADH, which was measured at 340 nm in the spectrophotometer¹. The reaction is equimolar, and the production of NADH is directly proportional to ethanol oxidation, and therefore to the ethanol concentration present in the culture medium.

Cell cultures: NRK cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 20 mM L-glutamine, 10 mM sodium pyruvate, 100 mg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin. Cell cultures were maintained at 37 °C in humidified 5% CO₂ atmosphere. Primary cultures of cortical astrocytes were prepared from newborn (P1) Wistar rats as previously reported². Briefly, cells were plated into 75 cm² flasks in DMEM culture medium supplemented with 10 % FBS. Cell cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Before confluence, cells were replated and grown for at least 7 days in the absence or presence of ethanol. The purity of astrocytes cultures was assessed by immunofluorescence using anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody³, which showed that cell cultures contained 90-95 % of astrocytes. All experiments using rats were approved by the appropriate institutional review committee and performed in strict compliance with the European Community Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

¹ Allali-Hassani A., Martínez S.E., Peralba J. M., Vaglenova J., Vidal F., Richart C., Farrés J., Parés X., *FEBS Letters* **1997**, *405*, 26

² Martínez S.E., Lázaro-Dieguez F., Selva J., Calvo F., Piqueras J.R., Crespo P., Claro E., Egea G., *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1044

³ Renau-Piqueras J., Zaragoza R., De Paz P., Bagueña-Cervellera R., Megias L., Guerri C., *J. Histochem. Cytochem.* **1989**, *37*, 229

Fluorescence microscopy: NRK cells and astrocytes were grown in coverslips to 70% of confluence and then were fixed in 4 % (w/v) formaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, washed in PBS (3X5 min each) and incubated in PBS containing 50 mM ammonium chloride for 20 min. Cells were then permeabilized for 10 min with PBS containing 0.1 % saponin and 1 % BSA. The actin cytoskeleton was visualized by incubating cells for 30 min with 0.1 mg/mL FITC-labelled phalloidin (1:500) as previously described². Immunofluorescence was performed to evaluate ethanol-induced apoptosis in NRK cell cultures by examining caspase-3 activation using antibody to cleaved caspase-3 fragments (1:100) to detect endogenous levels of the fragments of activated caspase-3. Secondary antibodies conjugated with Cy2 or Cy3 were used at the following dilutions: anti-mouse (1:50) and anti-rabbit (1:250). In all experiments, cell nuclei were stained with DAPI (1:500). Coverslips were mounted on microscope slides using Mowiol (Calbiochem, EMD Biosciences, Darmstadt, Germany). Microscopy and imaging were performed with a B360 epifluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan) and an Orca-ER cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics, Japan). The images were processed using Adobe Photoshop CS software (Adobe Systems, San Jose, CA).

Cell counting: Unbiased stereological counts of cells were obtained using the Computer Assisted Stereology Toolbox (CAST) software (Olympus Denmark A/S). Total number of cells (visualized by DAPI staining) and cells with a rounded morphology (visualized by phalloidin staining) were counted.

F-/G-actin assay: NRK cells were homogenized in lysis buffer (50 mM PIPES, pH 6.9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% (v/v) glycerol, 0.1% Nonidet P40, 0,1% Triton X-100,

0.1% Tween 200, 1% 2-mercaptoethanol and 0.001% antifoam C) containing 250 nM of TRITC-phalloidin. Lysates were centrifuged at 45,000 rpm for 1 h at room temperature. Pellet contained the F-actin fraction and the supernatant contained the G-actin fraction. Samples were analyzed by immunoblotting for actin.

Immunoblotting: Cell extracts were prepared from fresh cell cultures by adding 2 volumes of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 7.4). Protein was measured in 10 μ L of each lysate by the Advanced Protein Assay™ (Cytoskeleton Inc.). Equal amounts of lysate were subjected to 15% (v/v) sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Blots were blocked in 5%-non-fat dry milk/TBST buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) and immunoblotted for different antigens. Actin was detected using rabbit anti-actin antibody (1:5,000). Caspase-3 was detected by using either mouse anti-caspase-3 or anti-cleaved caspase-3 antibodies (1:1,000). Monoclonal α -tubulin antibody (1:50,000) was used as a loading control. All primary antibodies were incubated overnight at 4°C. Blots were then labeled either with goat anti-rabbit IgG HRP (1:3,000) or goat anti-mouse IgG HRP (1:3,000) for 1 h and incubated for 5 min with enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the supplier's instructions. Bands were visualized by exposure of the membrane to Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Band intensities were measured by densitometry scanning of the film using a GS-700 Imaging Densitometer with Multi-Analyst 1.1 software (Bio-Rad Laboratories, Hercules,

CA, USA). Immunoblots shown are representative of at least three independent experiments.

Statistical analysis: Results are expressed as the mean \pm standard deviation (SD) from duplicate determinations of three or four independent experiments, and an unpaired two-tailed Student *t* test (GraphPad Software, San Diego California USA) was used for statistical analysis. In dose-dependence studies, results were analyzed using one-way ANOVA statistical test followed by the Bonferroni's multiple (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

2. Supplementary figures

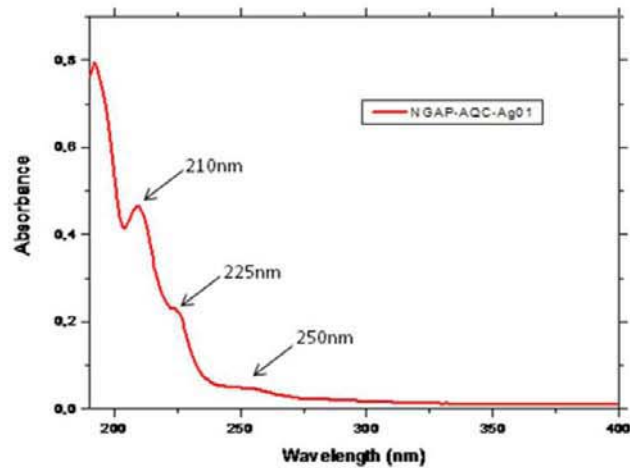


Figure S1. UV-Visible Absorption Spectrum of AgAQC dispersions in water showing some well-resolved peaks along with a continuous increase of absorption with decreasing wavelength in the UV-region

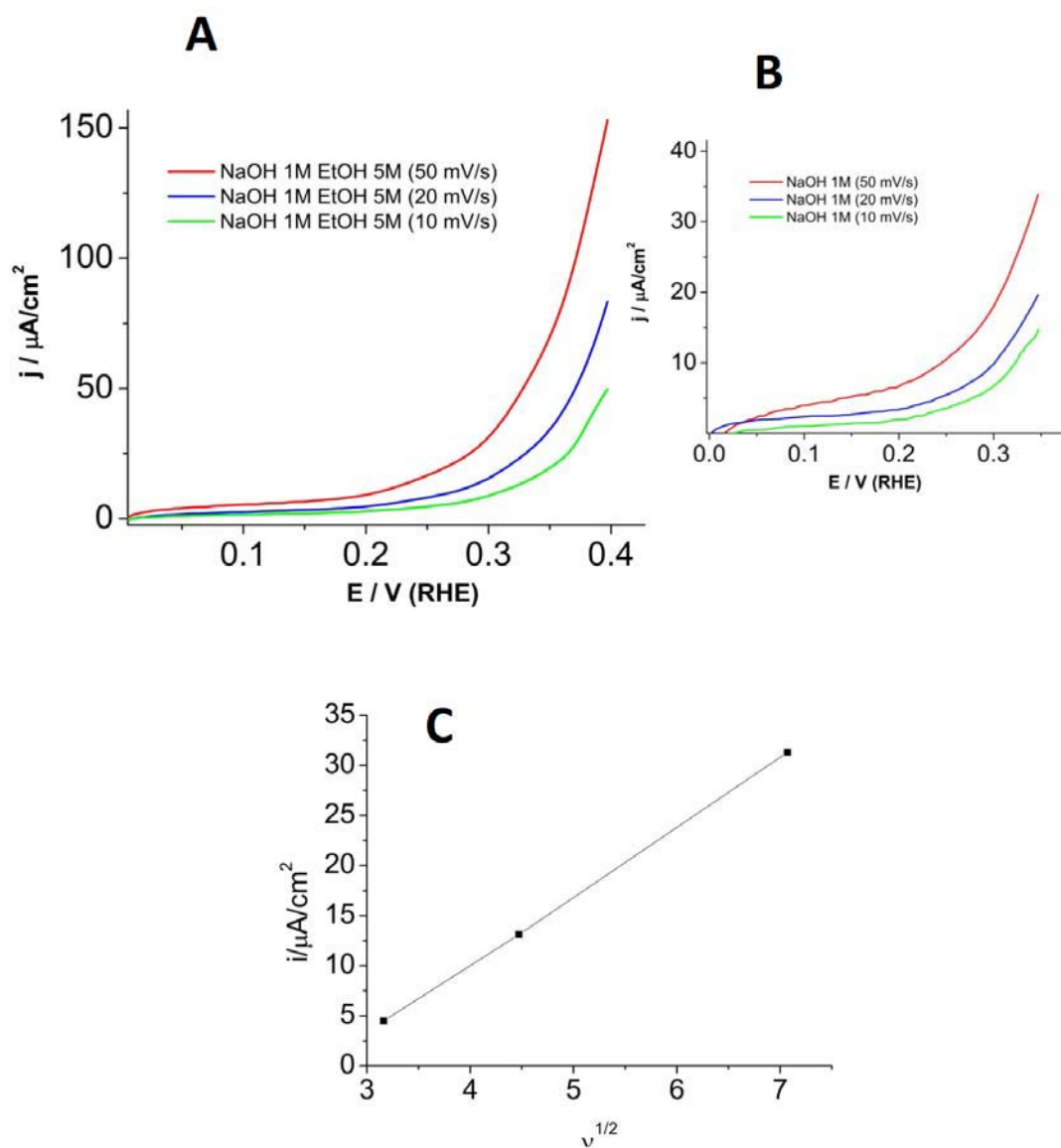


Figure S2a. (A) Linear Sweep Voltammograms of the oxidation of ethanol in basic (NaOH) media at different scan rates. (B) Blank. Dependence on the scan rates shows that a diffusive control is only observed for potentials $> \approx 0.3\text{V}$. (C) Dependence on the scan rate at 0.4V showing a diffusive control.

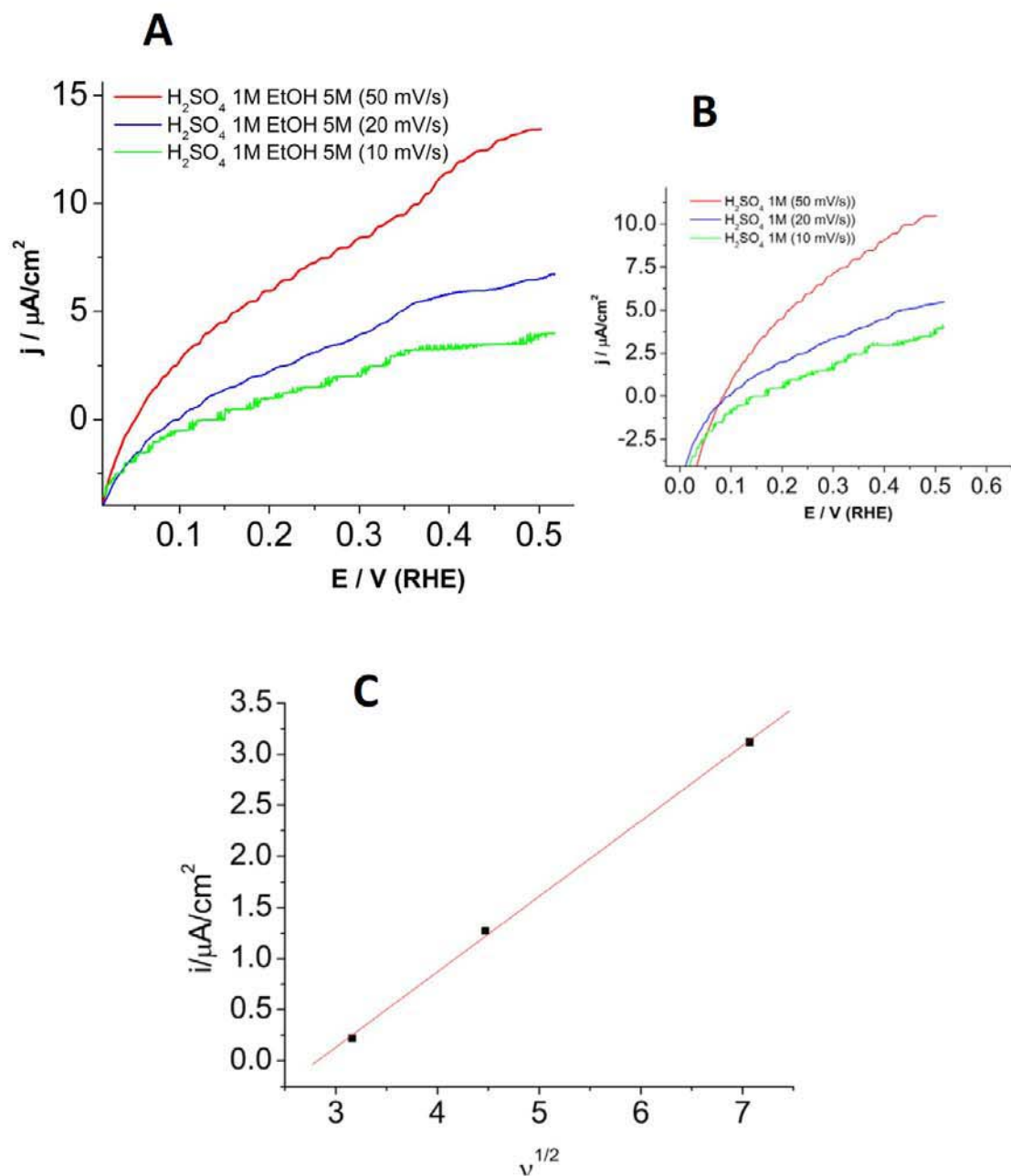


Figure S2b. (A) Linear Sweep Voltammograms of the oxidation of ethanol in acid (H_2SO_4) media at different scan rates. (B) Blank. Dependence on the scan rates shows that a diffusive control is only observed for potentials $> \approx 0.3\text{V}$. (C) Dependence on the scan rate at 0.5V showing a diffusive control.

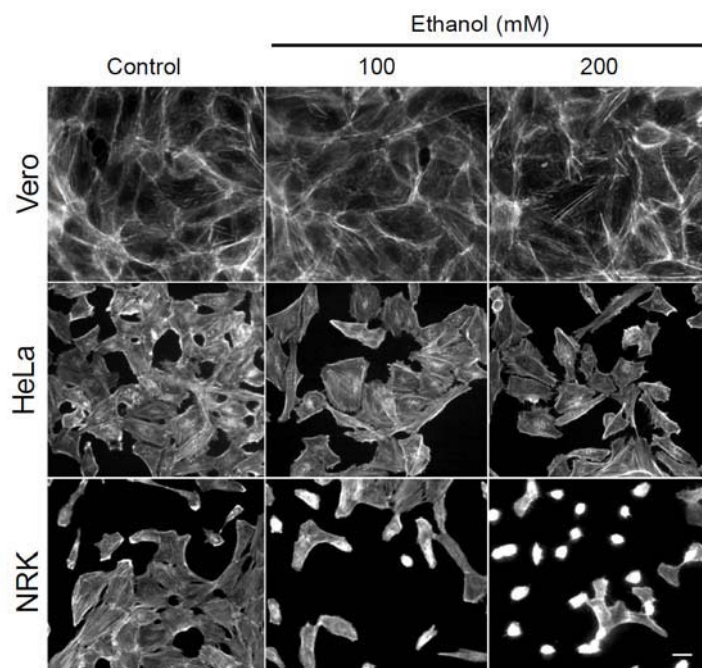


Figure S3. NRK cells are a suitable cell line model to evaluate the effects of short-term ethanol exposures on the actin cytoskeleton organization. HeLa, Vero and NRK cells were exposed to different concentrations of ethanol (100 and 200 mM) for several periods of time (10, 30, 60 and 120 min) and the cell shape and the actin cytoskeleton organization was evaluated by fluorescence microscopy using FITC-phalloidin. Notice that, after 30 minutes of ethanol exposure, only NRK cells showed an actin cytoskeleton reorganization. Concomitantly to these actin rearrangements, cells round-up in a concentration-dependent manner. These alterations were stronger in cells exposed to 200 mM ethanol. Scale bar, 10 μ m.

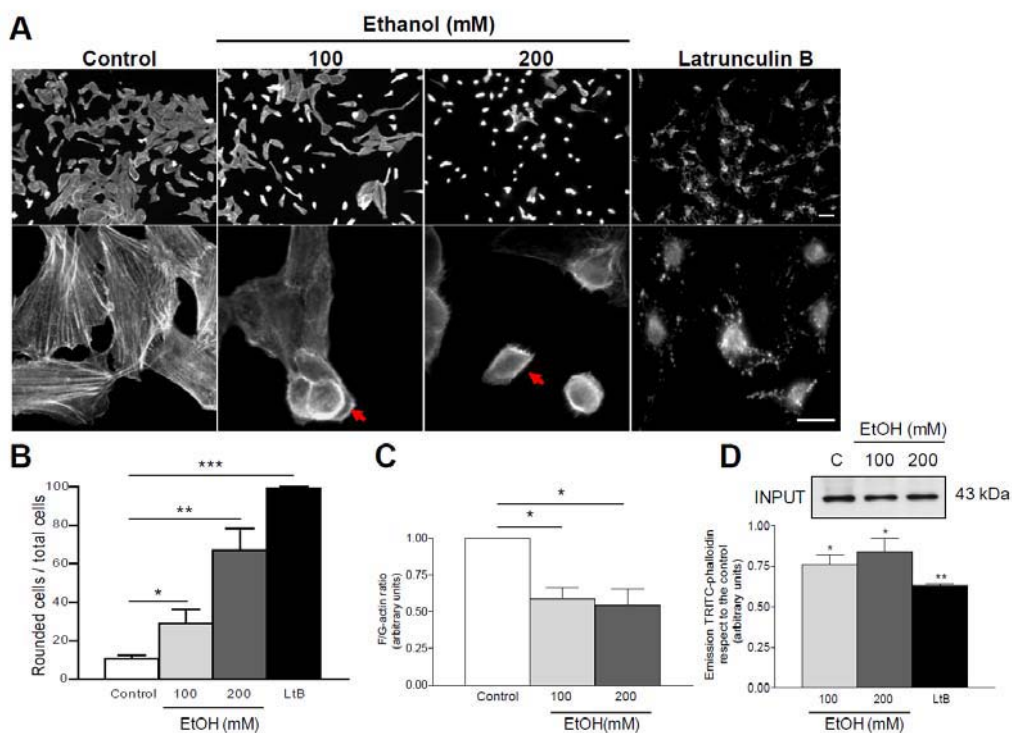


Figure S4. Short-term ethanol exposure induces actin cytoskeleton disorganization and actin depolymerization. (A) Unexposed (control) and ethanol (100 and 200 mM, 30 min)-exposed NRK cells were stained with FITC-phalloidin to visualize the actin cytoskeleton. Latrunculin B (LtB; 500 nM, 90 min), which is a toxin that depolymerizes F-actin, was used as a positive control for actin depolymerization. Scale bars: 20 μ m and 10 μ m. (B) Quantitative analysis of results showed in panel A. Bars represent the ratio between the number of rounded cells (indicated by red arrows in A) and the total cell number. Statistical significance according to one-way ANOVA, (*) $p \leq 0.05$, (**) $p \leq 0.01$ and (***) $p \leq 0.001$. (C) Ratio between filamentous (F-actin) and globular (G-actin) actin as a measurement of the actin cytoskeleton integrity. Statistical significance using the Student's *t* test, (*) $p \leq 0.05$. (D) Quantification of F-actin. Input corresponds to the internal loading control of protein (actin). Bars show the normalized ratio of TRITC-phalloidin respect to the control. Statistical significance using the Student's *t* test, (*) $p \leq 0.05$ and (**) $p \leq 0.01$.

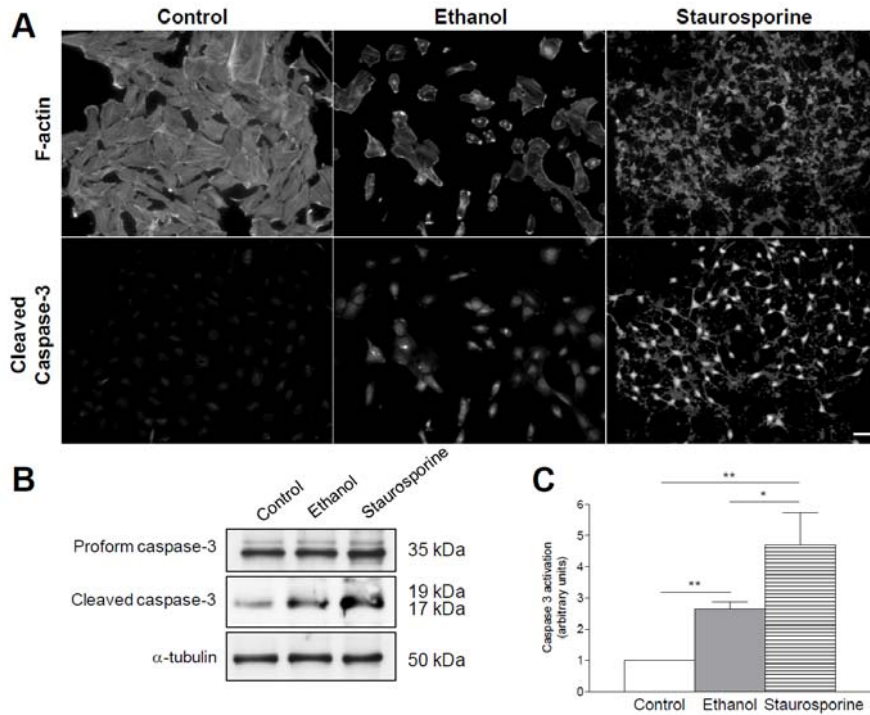


Figure S5. Short-term ethanol exposure induces apoptosis. (A) Unexposed (Control) and ethanol (200 mM, 30 min)-exposed NRK cells were stained with FITC-phalloidin to visualize the actin cytoskeleton (F-actin). Co-immunostaining with anti-cleaved caspase-3 antibodies was also performed to visualize the appearance of active caspase-3 in the nucleus (caspase-3). Incubation with staurosporine (1 μ M, 2 h) was performed as a positive control of apoptosis induction⁴. Scale bar: 20 μ m. (B) Immunoblot analysis of unexposed (control), ethanol- or staurosporine-exposed NRK cells shown in panel A. Caspase-3 activation was detected using antibodies against active caspase-3 fragments (19 and 17 kDa) and antibodies against pro-caspase-3 (35 kDa). Tubulin was used as a loading control (α -tubulin). (C) Quantitative analysis of the caspase-3 activation in ethanol- and staurosporine-exposed cells shown in panel B. Statistical significance according to one-way ANOVA, (*) $p \leq 0.05$ and (**) $p \leq 0.01$.

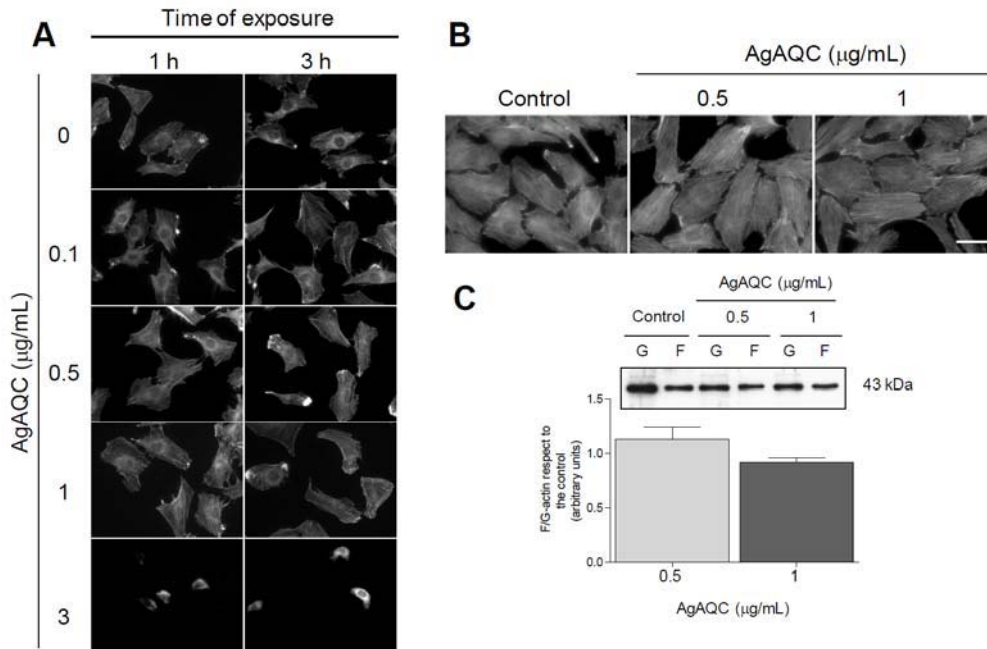


Figure S6. AgAQC cytotoxicity in NRK cells. NRK cells were incubated with different concentrations of AgAQC (from 0.1 to 5 μ g/mL) and analyzed at different times (from 30 min to 3 h) for the cellular morphology, the actin cytoskeleton organization, and the F-/G-actin ratio. (A) Actin cytoskeleton organization and cell shape was evaluated by fluorescence microscopy using FITC-phalloidin (see Fig. S4A and B). Actin cytoskeleton remained unaltered at concentrations of AgAQC up to 1 μ g/mL for either 1 h or 3 h. At higher AgAQC concentrations, the number of cells significantly decreased (data not shown) and those that remained attached showed a severe shrinkage, which is indicative of cellular damage. Scale bar, 20 μ m. (B) NRK cells were exposed to non-toxic AgAQC concentrations (0.5 and 1 μ g/mL) for 30 min and the actin cytoskeleton was examined with FITC-phalloidin. Scale bar, 10 μ m (C) The effect of non-toxic concentrations of AgAQC (0.5 and 1 μ g/mL) was also evaluated for the F-/G-actin ratio. Immunoblotting (upper panel) and its quantification (lower panel) showed that F/G-actin ratio remained unaltered in cells exposed to AgAQC.

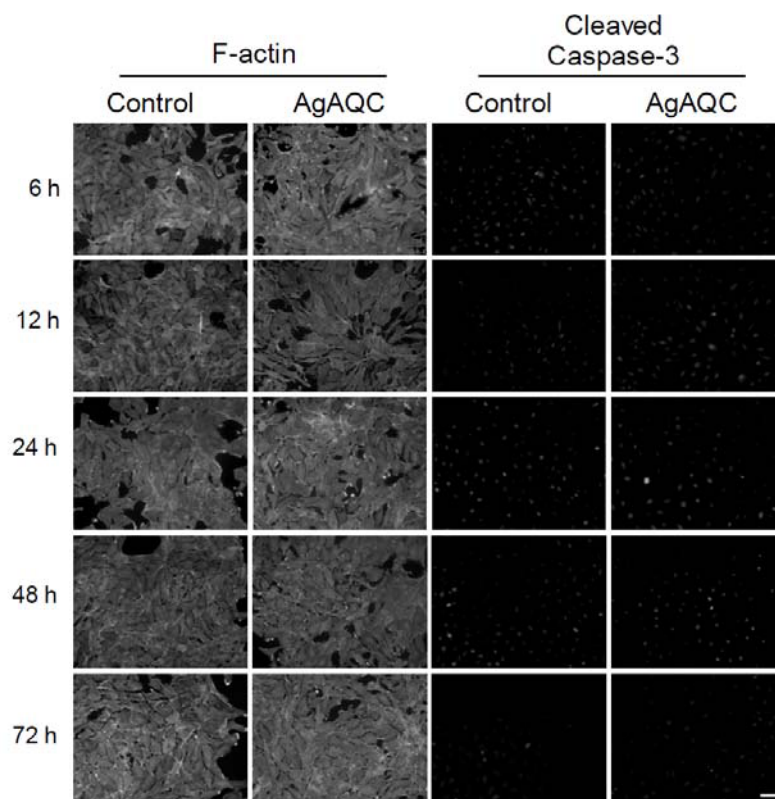


Figure S7. AgAQCs are not cytotoxic at long-term exposures. NRK cells were incubated with AgAQCs (1 mg/mL for 6, 12, 24, 48 and 72 h) and co-stained with FITC-phalloidin to show the actin cytoskeleton and with anti-cleaved caspase-3 antibodies to visualize apoptosis. The cell morphology, actin cytoskeleton organization and activation of caspase-3 were unaltered. Scale bar, 20 μ m.

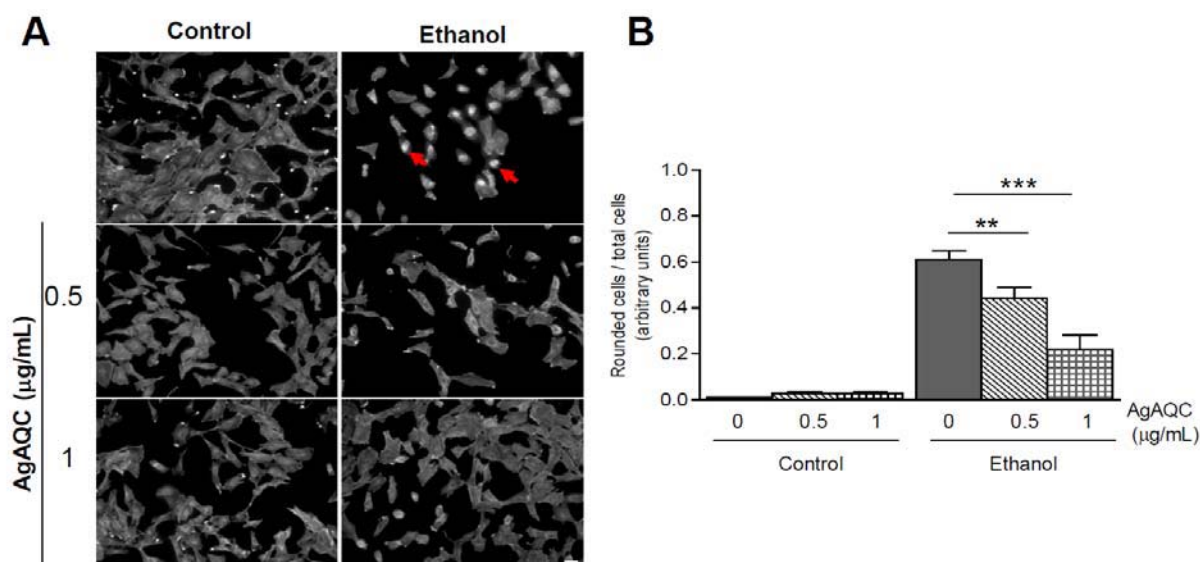
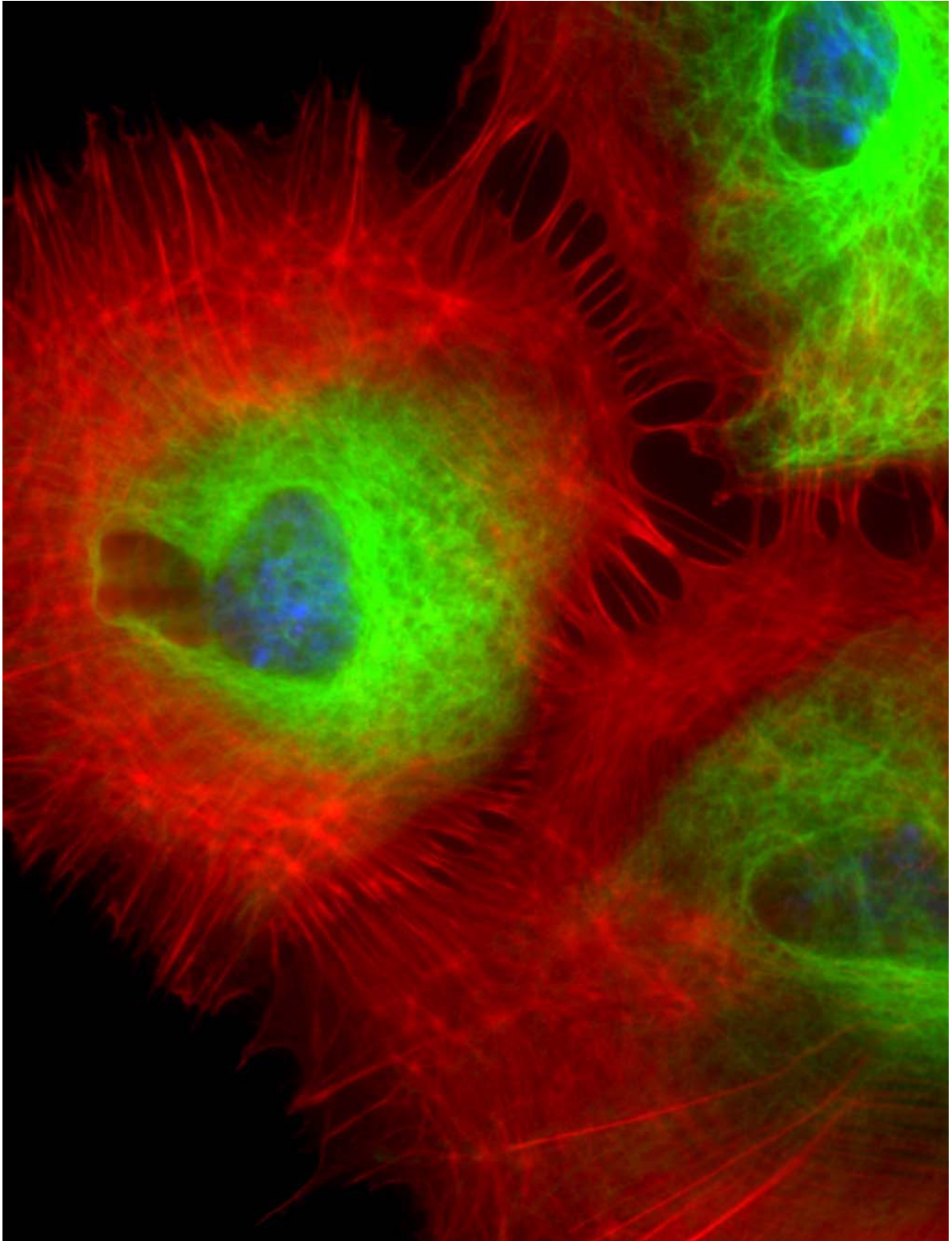


Figure S8. AgAQCs prevent the ethanol-induced alterations in the cellular morphology and actin cytoskeleton organization in a concentration-dependent manner. (A) Ethanol (200 mM)-exposed NRK cells were incubated in the absence or presence of AgAQCs at different concentrations for 30 min. The cellular morphology and actin cytoskeleton organization (F-actin) were evaluated by FITC-phalloidin staining. Scale bar: 20 μ m. (B) Ratio of rounded cells (red arrows in A) respect to total cells. Statistical significance according to one-way ANOVA, (**) $p \leq 0.01$ and (***) $p \leq 0.001$.



IV. - DISCUSIÓN

El consumo abusivo de alcohol (etanol) provoca efectos deletéreos en el Sistema Nervioso Central (SNC) generando numerosos desórdenes y patologías. Durante el embarazo, el consumo de alcohol puede causar en el feto malformaciones craneofaciales, retraso en el crecimiento y daños en el SNC (Streissguth y col., 1982; Eckardt y col., 1998; Martínez y Egea 2007). Este conjunto de síntomas detectado en los descendientes de mujeres alcohólicas se engloba con el término de Desordenes Relacionados con el Alcoholismo Fetal (DRAF). Dentro de los DRAF, la patología más evidente y diagnosticable es el Síndrome Alcohólico Fetal (SAF), la causa más importante de retraso mental no genético en la sociedad occidental (*American Academy of Pediatrics*, 2000). A pesar de que los DRAF pueden prevenirse evitando la ingesta de alcohol durante el embarazo y la lactancia, cada año se produce un incremento de su incidencia (*American Academy of Pediatrics*, 2000).

Para conocer los mecanismos moleculares implicados en la aparición de algunos de las múltiples alteraciones producidas por el etanol, utilizamos cultivos primarios de astrocitos de ratas neonatales. Es un modelo *in vitro* bien establecido (Vallés y col., 1997; Miñana y col., 1998; Tomás y col., 2002, 2003, 2005). Los astrocitos son la primera población neural que recibe el impacto del alcohol y su viabilidad es crucial para las neuronas (comentado en el apartado 2.3 de la introducción). El alcohol afecta a diversos procesos del desarrollo cerebral aunque nosotros nos hemos centrado en 1) elucidar el mecanismo a través el cual la exposición crónica a etanol afecta las vías de transducción de señales implicadas en la organización y dinámica del citoesqueleto de actina, y 2) encontrar potenciales farmacoterapias que puedan prevenir, o al menos mitigar, las consecuencias de la exposición prenatal a etanol. Primero analizamos la implicación de moléculas como las RhoGTPasas y los fosfoinosítidos en las reorganizaciones en el citoesqueleto de actina producidas por el etanol. Seguidamente, decidimos analizar más detalladamente que moléculas estaban involucradas en la perturbación de la activación de RhoA a causa de la exposición a etanol, centrándonos en las proteínas RhoGAP, claves en la inactivación de RhoA. De forma paralela, hemos examinado el ácido lisofosfatídico (LPA) como potencial agente citoprotector en la etiopatogenia de los DRAF y evaluado el potencial efecto protector de los *Silver Atomic Quantum Clusters* (AgAQC) como herramienta nanobiomédica en cultivos celulares expuestos a etanol de forma aguda.

1. Mecanismos moleculares por los cuales el etanol afecta la organización del citoesqueleto de actina

En los tres trabajos, principalmente en el primero y segundo, hemos escogido los cultivos primarios de astrocitos de rata neonatales como modelo de estudio porque: 1) es el tipo celular más abundante en el SNC, 2) juega un papel fundamental en el soporte estructural y funcional de las neuronas; y 3) porque la gliogénesis que tiene lugar en estadios prenatales (tercer trimestre en humanos) ocurre a nivel postnatal en ratas. Estos estudios tienen su origen en la investigación de dos procesos fundamentales para el desarrollo y mantenimiento de las funciones cerebrales: la captación de glucosa y su disponibilidad en el cerebro, y la glicosilación de las proteínas. La glucosa es una fuente de energía esencial y su disponibilidad para las neuronas está condicionada principalmente por los astrocitos (Vesce y col., 1999). En el desarrollo del SNC son necesarias las interacciones entre neuronas y astrocitos, y muchas de ellas se realizan a través de glicoproteínas (Grumet, 1992). El efecto del etanol en la captación de glucosa y los transportadores de glucosa (GLUTs) ha sido ampliamente estudiado (Hu y col., 1995; Singh y col., 1996), así como la alteración de los procesos de glicosilación en neuronas (Braza-Boïls y col., 2006).

En estudios anteriores hemos descrito que la exposición a etanol altera la maquinaria molecular del proceso de glicosilación, produciendo: a) heterogeneidad en algunas glicoproteínas, b) retención de glicoproteínas en el aparato de Golgi, c) alteración de la ultraestructura del aparato de Golgi, y d) disminución de los niveles de algunas glicoproteínas implicadas en la función de este orgánulo y/o transporte intracelular (Tomás y col., 2002). El tráfico de la síntesis de glicoproteínas y glicolípidos en astrocitos está ralentizado por el efecto del etanol. En relación a ello, la exposición crónica a etanol también inhibe el proceso de endocitosis y transcitosis (Megías y col., 2000; Nagy y col., 2002) provocando un aumento en la captación de glucosa (Tomás y col., 2002). El incremento de captación de glucosa estaba relacionado con un aumento de la expresión de los transportadores de glucosa (GLUT1) (Tomás y col., 2002) y probablemente con un aumento del tiempo de residencia en la membrana plasmática de GLUT1, como consecuencia de una endocitosis alterada. A partir de entonces, se hipotetizó que ello era debido a una alteración en la organización y dinámica del citoesqueleto de actina, ya que el tiempo de residencia de los transportadores en la membrana plasmática depende de la dinámica de la actina (Bunn y col., 1999; Qualmann y Kessels, 2002). Posteriormente, se comprobó que en efecto una despolimerización de los filamentos de actina, incrementaba la captación de glucosa (Tomás y col., 2003), lo cual

proporcionaba la relación directa entre la disrupción del citoesqueleto y el aumento en la captación de glucosa. Además, cuando se visualizó el citoesqueleto de actina de astrocitos expuestos a etanol de forma crónica, se observó un descenso en las fibras de estrés y una reorganización del citoesqueleto en forma de 'anillos corticales' (Tomás y col., 2003). Sorprendentemente, los microtúbulos no veían alterada su organización, sino su dinámica de repolimerización (Tomás y col., 2003). Aunque se desconocía la base molecular de estas alteraciones, nuestros datos y los de otros laboratorios (Slater y col., 2003; Joshi y col., 2006; Schaffert y col., 2006) sugerían la implicación de moléculas reguladoras de la dinámica y organización del citoesqueleto de actina tales como las RhoGTPasas y los fosfoinosítidos. Estas evidencias fueron: a) el etanol alteraba la vía de señalización RhoA/ROCK, provocando una disminución de las fibras de estrés; b) la expresión de un mutante constitutivamente activo de RhoA, y el tratamiento con ácido lisofosfatídico (LPA) (conocido activador de RhoA) (Ramakers y Moolenaar, 1998) revertían los efectos inducidos por el etanol en el citoesqueleto de actina (Tomás y col., 2003); c) se había demostrado que la exposición aguda a etanol provocaba alteraciones en efectores de RhoA, activando la quinasa de RhoA (ROCK) y fosforilando la cadena ligera de la miosina (MLC) (Miñambres y col., 2006), y d) el etanol competía con el agua en la reacción catalizada por la fosfolipasa D (PLD) (Klein, 2005; Newton y Messing, 2006) y en consecuencia el producto de la reacción, el ácido fosfatídico (PA), lo que podía conllevar una disminución de los niveles de los fosfoinosítidos (moléculas de gran importancia en la regulación del citoesqueleto de actina).

En este escenario, nuestra hipótesis era que el etanol debía actuar en algún punto de la vía de transducción de señales implicada directamente en la dinámica y/o organización del citoesqueleto de actina.

1.1. Alteración de la transducción de señales mediada por RhoA

Con los antecedentes anteriores, se estudiaron en detalle estas posibles dianas moleculares del etanol en astrocitos de rata corticales y cerebelares, dos regiones altamente sensibles al etanol durante el desarrollo (Eckardt y col., 1998; Cudd, 2005). Obviamente, todo ello a 30 y 100 mM concentraciones de etanol, concentraciones similares a las encontradas en la sangre de madres alcohólicas (Urso y col., 1981; Church y Gerkin, 1988; Jones y Sternebring, 1992; Eckardt y col., 1998). La exposición crónica a etanol provocaba una reorganización del citoesqueleto a través de la cascada de señalización de RhoA/ROCK. Cabía esperar la posibilidad de que el etanol estuviese alterando los niveles proteicos de RhoA, sin embargo, los niveles proteicos de RhoA no variaban, ni los de otras RhoGTPasas clásicas como Rac y Cdc42.

La acción específica del etanol provocaba una disminución de la activación RhoA, la forma activa (RhoA-GTP), tanto en astrocitos corticales como cerebelares. Sin embargo, los niveles de Rac y Cdc42 activas (Rac-GTP y Cdc42-GTP) se mantenían inalterados. Por lo tanto, tales observaciones indicaban que las dianas moleculares del etanol probablemente estaban centradas en la regulación del ciclo de activación y desactivación de RhoA.

Las GTPasas alcanzan su estado activo (unido a GTP) gracias a intercambiadores de GTP/GDP (GEF, factores intercambiadores de guanina) (Bos y col., 2007). Se inactivan cuando se unen a GDP y ello se consigue por la hidrólisis de GTP que estimulan las proteínas activadoras de la actividad GTPasa (GAP) (Bos y col., 2007). Con anterioridad, se había descrito que el etanol era capaz de alterar tanto GAPs (Rothenfluh y col., 2006), como GEFs (Offenhäuser y col., 2006) en *Drosophila* y ratones, respectivamente. Por lo tanto, teniendo en cuenta la mecánica de este proceso, analizamos las actividades de RhoGEF y RhoGAP en astrocitos expuestos a etanol. La actividad RhoGEF no variaba. En cambio, el etanol sí que provocaba un incremento de la actividad RhoGAP total, hecho que explicaba el descenso de los niveles endógenos de RhoA-GTP. Por lo tanto, el siguiente paso consistía en identificar qué RhoGAP podría estar alterada por el etanol, siendo el objetivo principal del segundo trabajo.

En el genoma humano se han identificado unas 70 RhoGAPs diferentes (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). De todas ellas, hubo un par que nos interesaron y en las cuales centramos todos nuestros esfuerzos: las p190RhoGAPs. Diversos fueron los hechos que nos indujeron a estudiarlas (citados en el resumen previo al segundo trabajo). Las p190RhoGAPs se componen de dos isoformas muy similares (p190A y p190B), con una estructura muy similar (Jacobs y Hall, 2005) y con funciones solapadas en el desarrollo neural (Matheson y col., 2006). La búsqueda de dianas moleculares en la etiopatogenia de los DRAF no es un hecho excepcional, ya que estudios anteriores habían identificado otras dianas del etanol en la migración neuronal (Carter y col., 2008) o en la regulación de la expresión de subunidades de los receptores NMDA (Anji y Kumari, 2006). Sin embargo, la función de las p190RhoGAPs en neuronas es relevante en procesos como la guía axonal (Chardin P, 2006) y el desarrollo neural (Brouns y col., 2000), pero en cuanto a las células gliales, solamente se conocía la participación de p190RhoGAPs en el proceso de maduración de los oligodendrocitos (Wolf y col., 2001; Wang y col., 2009). Por tanto, en primer lugar cabía saber si los astrocitos de rata expresan p190RhoGAPs. Demostramos aquí por primera vez que efectivamente ambas p190 se encuentran en estas células. Nuestra hipótesis previa era que probablemente el aumento de actividad RhoGAP inducido por el etanol se debiera a un aumento de la expresión génica y consecuentemente a un aumento en los niveles proteicos. Sorprendentemente, a lo largo del cultivo la exposición a etanol no variaba la cantidad de p190RhoGAPs en los astrocitos. En ese

momento, nos encontrábamos en una situación similar a la de la evaluación de RhoA como posible diana; es decir, el etanol podía no estar afectando la cantidad de p190RhoGAPs endógena, pero sí su actividad.

Había evidencias experimentales que nos indicaban que las p190RhoGAPs de los astrocitos expuestos crónicamente a etanol estaban más activas. Primero, se observó que en aquellos astrocitos expuestos a etanol deplecionados de p190RhoGAPs, no se producía el incremento de actividad RhoGAP total observada previamente (Martínez y col., 2007). Además, astrocitos expuestos a etanol eran capaces de aumentar la actividad de p190RhoGAPs en fracciones inmunoprecipitadas. Por lo tanto, directa e indirectamente se observó que el etanol promovía una activación de p190RhoGAPs. En ausencia de p190RhoGAPs se seguía detectando actividad RhoGAP, lo cual nos indicaba que probablemente existan otras RhoGAPs en astrocitos no descritas todavía. Sin embargo, esta actividad RhoGAP residual no parecía estar alterada por el etanol. Trabajos anteriores han demostrado que la p190A activada se une más a formas activas de RhoA (Noren y col., 2003; Barberis y col., 2005). Nuestros resultados indicaron, realmente, que el etanol fomentaba un aumento de la capacidad de unión entre las p190RhoGAPs y su sustrato, RhoA-GTP; y que por lo tanto las p190RhoGAPs presentan más activación en aquellas muestras expuestas a etanol. No obstante, las p190RhoGAPs no son capaces de ejercer su función sin la ayuda de otras moléculas que las acompañen o activen. Es conocido que otra GAP, en este caso de Ras, p120RasGAP forma un complejo con p190A y promueve su activación (Bradley y col., 2006). En astrocitos expuestos a etanol, en los cuales apreciamos un aumento de actividad de p190RhoGAPs, observamos que también existe una mayor formación de complejo p190A-p120RasGAP que en astrocitos control. Este hecho corroboraba los datos obtenidos anteriormente ya que la formación del complejo con p120RasGAP es un indicador de la activación de p190A. Por otro lado, se ha descrito y hemos confirmado que la interacción entre p190B y p120RasGAP es nula (Matheson y col., 2006) (Figura 3 del segundo trabajo). De todas formas, la alteración de p120RasGAP por parte del etanol era algo que ya se había descrito previamente y que concuerda con nuestros resultados (Luo y Miller, 1999).

Otras proteínas se han descrito como moduladoras de la actividad de p190RhoGAPs, como es el caso de p120catenina (Wildenberg y col., 2006) o la quinasa de las adhesiones focales (FAK) (Tomar y col., 2009), la cual es necesaria para reclutar el complejo p190RhoGAP-p120RasGAP a la membrana plasmática. La interacción con FAK, un importante regulador de la formación de contactos focales, guardaría relación con el hecho de que el etanol produce una disminución del número de contactos focales (Miñambres y col., 2006).

Otro parámetro para evaluar la activación de p190RhoGAPs es su redistribución a la membrana plasmática. En condiciones de activación las p190RhoGAPs se relocalizan en la membrana para ejercer la hidrólisis de GTP de RhoA y Rac (Tomar y col., 2009; Brouns y col., 2000; Bradley y col., 2006). Nosotros observamos que en astrocitos expuestos a etanol, se produce una relocalización de ambas p190RhoGAPs en la periferia celular. En resumen, hemos conseguido demostrar que el aumento de actividad RhoGAP inducido por el etanol y descrito en el primer artículo viene dado por una sobreactivación de las p190RhoGAPs.

Otra cuestión interesante para elucidar en el futuro es qué molécula(s) está(n) activando específicamente las p190RhoGAPs y si se ven afectadas por el etanol. La activación de p190RhoGAPs se realiza mediante fosforilación y varios estudios han descrito diferentes quinasas encargadas de fosforilar y activar a p190A. En cuanto a las quinasas que fosforilan sus residuos de serinas/treoninas se conoce la acción de ROCK (Mori y col., 2009) y de PKC (Brouns y col., 2000); y algunas quinasas fosforiladoras de tirosinas de la familia Src (Brouns y col., 2001; Wildenberg y col., 2006), la familia Abl (Hernández y col., 2004), o FAK (Tomar y col., 2009) también fosforilan p190A. No obstante, la fosforilación de p190A también está regulada por la acción de fosfatasa como la fosfatasa de bajo peso molecular (LMW-PTP) (Niessen, 2006) o la PTP20 (Shiota y col., 2003). En cuanto a la isoforma p190B, se sabe que no presenta tanta fosforilación por tirosinas como p190A y solamente se conoce fosforilaciones mediadas por insulina y IGF-1R (Sordella y col., 2003).

Poder identificar las dianas moleculares por las cuales el etanol altera el citoesqueleto de actina, el transporte intracelular y consecuentemente muchos aspectos neurológicos dependientes de la comunicación entre neuronas y células gliales (Bezzi y Volterra, 2001; Volterra y Meldolesi, 2005; Iadecola y Nedergaard, 2007) nos aportaría conocimiento para intentar contrarrestar ciertas disfunciones del SNC en individuos con DRAF, y tal vez paliar así alteraciones cognitivas y comportamentales que puedan darse en su vida adulta. Así, las personas afectadas por DRAF, debido a sus discapacidades, tienen necesidades especiales que requieren ayuda a lo largo de sus vidas en temas relacionados con administración de patrimonio, aprendizaje, comprensión de las consecuencias que pueden tener sus actos y la interacción con otras personas. Los individuos que padecen DRAF tienen más probabilidades de desarrollar problemas de salud mental, problemas con la justicia, absentismo escolar, alto índice de desempleo y problemas de adicción a sustancias de abuso. Intentando relacionar estas alteraciones neuropsico-sociológicas con procesos moleculares, algunos estudios han encontrado un nexo con proteínas reguladoras del citoesqueleto de actina y concretamente RhoGAPs. Recientemente, un estudio describía que la pérdida de RhoGAP18B en *Drosophila* provocaba una resistencia frente a los efectos sedantes del etanol (Rothenfluh y col., 2006).

Otro trabajo asociaba la inactivación de una RhoGAP altamente expresada en el cerebro (Oligonefrina-1) con el retraso mental. La pérdida de función de Oligonefrina producía alteraciones cognitivas a través de la vía de señalización de RhoA afectando al crecimiento axonal y de las dendritas (Billuart y col., 1998). Ello podría guardar relación con el retraso mental que experimentan los casos más severos del alcoholismo fetal. Más concretamente, se ha descrito que p190A puede influir en el condicionamiento de temor (Lamprecht y col., 2002; Settleman, 2003) produciendo, también, pérdida de estructuras dendríticas e induciendo sensibilidad y flexibilidad de comportamiento frente a sustancias de abuso (Gourley y col., 2009). Esto último, guarda relación con el hecho de que el aumento de la actividad RhoGTPasa en el cerebro se ha descrito como potenciadora del aprendizaje y la memoria (Diana y col., 2007).

Por ello, si tenemos en cuenta nuestros resultados y los datos de la bibliografía, se podría hipotetizar que un aumento de la actividad de las p190RhoGAPs, con su consecuente disminución de RhoA activa, alteraría las estructuras dendríticas, reduciría la capacidad de aprendizaje y memoria, y produciría un aumento del condicionamiento del temor. Ambos factores inducirían más predisposición al consumo de sustancias de abuso y demás desordenes sociales, lo que coincide con individuos adultos que han padecido exposición al alcohol en estadios fetales. No obstante somos conscientes que estas alteraciones descritas son una de las muchas rutas de señalización afectadas por el etanol en el desarrollo del SNC y probablemente muchos otros factores estén implicados.

1.2. Alcohol y fosfoinosítidos

Los fosfoinosítidos (PIPs) son fosfolípidos de membrana que abastecen de anclaje para diversos tipos de moléculas, como el complejo polimerizador de actina Arp 2/3 (Takenawa y Itoh, 2001), las RhoGTPasas (Di Paolo y De Camili, 2006) o moléculas implicadas en la regulación de la actividad RhoGTPasa (Saarikangas y col., 2010). Nuestra hipótesis es que el etanol afecta la formación de los PIPs probablemente a través de la vía de señalización de la PLD. Al alterar esta vía se disminuiría la cantidad de PA y produciría fosfatidiletanol (Klein J, 2005). A niveles bajos de PA se generaría menos $PI(4,5)P_2$ probablemente debido a un descenso en la producción de fosfatidilinositol (PI) (Lykidis y col., 1997) y una menor actividad de las PIP5 quinasas (PIP5K) (Jones y col., 2000). Por lo tanto, al no existir unos niveles de $PI(4,5)P_2$ suficientes, el complejo Arp 2/3 o las RhoGTPasas no actuarían óptimamente en cuanto a la polimerización y regulación de la organización de actina, respectivamente. Estas alteraciones podrían estar estrechamente relacionadas con las observadas en la vía

RhoA/ROCK, ya que ciertos fosfolípidos son capaces de modificar la actividad de proteínas RhoGAP (Ligeti y col., 2004), concretamente p190RhoGAP (a través de sus reguladores) (Levay y col., 2009). Por lo tanto, el aumento de actividad en las p190RhoGAPs observado en el segundo trabajo se veía potenciado por una alteración en los niveles de PIPs. Adicionalmente, RhoA puede actuar como activador de la fosfolipasa D (PLD) (Klein, 2005; Exton, 2002). Por lo tanto, al existir un descenso de RhoA activa, ésta activará menos PLD y se generará menos ácido fosfatídico (PA), lo cual resultaría en una disminución de los niveles de PIPs.

En el primer trabajo estudiamos de forma paralela como el etanol afectaba otras moléculas reguladoras del citoesqueleto de actina, los PIPs. Nuestros hallazgos indicaron que la exposición crónica a etanol afectaba efectivamente a la ruta de síntesis de los PIPs, disminuyendo los niveles endógenos de PI(4)P y PI(4,5)P₂, dos de los PIPs con mayor implicación en la regulación de la dinámica y organización del citoesqueleto de actina (Yin y Janmey, 2003). Otros describieron con anterioridad que un aumento de los niveles de PI(4,5)P₂, provocados por la sobreexpresión de PIP5K se traducían en reorganizaciones en el citoesqueleto de actina (Shibasaki y col., 1997), y un descenso del PI(4,5)P₂ endógeno por la acción de fosfatasas o microinyección de anticuerpos contra PI(4,5)P₂ reflejaba una disrupción del citoesqueleto, falta de adhesión y adquisición de una morfología circular (Gilmore y Burridge, 1996; Sakisaka y col., 1997; Raucher y col., 2000). Nuestros resultados guardan relación con lo observado por otros grupos, ya que este descenso de los PIPs provoca reorganizaciones en el citoesqueleto de actina de aquellos astrocitos expuestos a etanol.

Estas alteraciones en los niveles de PIPs pueden guardar relación con las disfunciones en el SNC observadas en individuos con DRAF. Recientemente, se ha observado que la eliminación de una fosfatasa implicada en la ruta de biosíntesis de los PIPs altera regiones cerebrales como el estriado (Sasaki y col., 2010). Probablemente, el etanol podría ejercer efectos deletéreos similares en otras regiones cerebrales. Por otro lado, en diferentes trastornos neurológicos se ha hallado la implicación de estos fosfolípidos. En los trastornos bipolares un agente farmacológico ampliamente estudiado y utilizado gracias a sus efectos terapéuticos es el litio. El mecanismo de acción por el cual el litio es capaz de mejorar la calidad de vida de los individuos afectados por trastornos bipolares, es a través de una alteración de la señalización de los PIPs causada por una depleción del inositol (Harwood, 2005). Pensamos pues que al igual que en los trastornos bipolares, la alteración de los niveles endógenos de PIPs inducidos por el etanol pueden guardar relación con las disfunciones del SNC en aquellos individuos con DRAF.

2. Agentes citoprotectores y potenciales farmacoterapias frente al alcohol

El método más simple para la prevención de los DRAF es evitar la ingesta de alcohol durante el embarazo. Sin embargo, los índices de prevalencia nos indican que los riesgos que comporta la ingesta de etanol durante el embarazo no son suficientemente valorados por la población. Por lo tanto, mientras que la mayoría de los esfuerzos actuales se centran principalmente en campañas divulgativas de educación para erradicar el consumo de alcohol durante el embarazo, existen diversas estrategias farmacológicas para la prevención de los DRAF (comentadas en la introducción).

Actualmente, existen farmacoterapias destinadas a disminuir la adicción materna al alcohol (Rayburn y Bogenschutz, 2004) aunque no se conocen bien los efectos adversos de tales fármacos. Sin embargo, no existe ninguna farmacoterapia preventiva contra los efectos teratógenos del etanol que se utilice en humanos, todas están en estudios pre-clínicos. Por tanto, su efectividad y efectos no teratógenos en mujeres embarazadas deben ser evaluados y confirmados en estudios futuros. Este paso no es trivial, ya que existe un patrón espacio-temporal complejo de las distintas rutas moleculares que están implicadas en el daño cerebral causado por el etanol durante el desarrollo, que generan múltiples efectos pleiotrópicos. Esta complejidad se ve reflejada en la heterogeneidad de las dianas farmacológicas y en la limitada ventana temporal de acción de estos potenciales tratamientos. Todo ello, comporta una gran dificultad para alcanzar los estudios en las fases clínicas.

Debido a la falta de prevención, las farmacoterapias y/o intervenciones clínicas deben tenerse en consideración para mejorar la calidad de vida en niños con DRAF. De todas formas, una intervención eficiente requiere un diagnóstico temprano y el pertinente tratamiento estimulador cognitivo y motor después del nacimiento (Klintsova y col., 2002). Estudios recientes están intentando desarrollar biomarcadores (Bearer y col., 2004) que puedan indicar la exposición a etanol y el consecuente daño neuronal en los fetos para poder acelerar lo antes posible tratamientos preventivos.

2.1. Ácido lisofosfatídico

En trabajos anteriores hemos descrito que el ácido lisofosfatídico (LPA) revierte las alteraciones producidas por el etanol por lo que refiere a la captación de glucosa, la

organización del citoesqueleto de actina y la dinámica de microtúbulos (Tomás y col., 2003). El LPA es un conocido activador de la vía RhoA/ROCK (Ramakers y Moolenaar, 1998). Su mecanismo de acción es a través de receptores de membrana específicos (LPAR) acoplados a proteínas G heterotriméricas. La activación de algunos de los LPAR desencadena la activación de la vía de transducción dependientes de RhoA/ROCK y promueve la formación de fibras de estrés (Hall, 1998).

En el primer trabajo (Martínez y col., 2007) observamos que aquellos astrocitos que habían sido expuestos crónicamente a etanol, y luego tratados con LPA se normalizaban los niveles endógenos de RhoA-GTP, y los de fosfoinosítidos (PI, PIP y PIP₂).

Actualmente, se sabe que el LPA actúa estimulando la actividad RhoGEF (Vincent y Settleman, 1999; Buschbaum, 2007). Por lo tanto, nuestra hipótesis se basa en que el LPA es capaz de contrarrestar el aumento en la actividad RhoGAP inducida por el etanol, mediante un incremento de la actividad RhoGEF. Resultando todo ello en la normalización de los niveles de RhoA-GTP. Igualmente, la regularización de la actividad de RhoA, comportaría también una normalización de la PIP5K (Oude-Weernink y col., 2000; Tou y col., 2005) y la PLD, restableciendo por tanto los niveles de PIPs. La consecuencia final de todo ello es una correcta organización del citoesqueleto de actina.

En el contexto de las disfunciones del SNC en los individuos que sufren DRAF, una potencial administración de LPA en estadios prenatales podría supuestamente paliar las alteraciones inducidas por el etanol en la organización del citoesqueleto de actina de aquellos astrocitos afectados que causarían daños neuronales. No obstante, en términos de aplicabilidad como posible farmacoterapia, cabe destacar una limitación importante: el LPA no puede cruzar por sí mismo la barrera hematoencefálica (BBB). Por tal motivo cabría buscar soluciones como: 1) el uso de análogos capaces de cruzar la BBB, 2) co-transportarlo con moléculas que sí puedan cruzarla, o 3) el uso de agentes farmacológicos que puedan estimular la producción endógena de LPA por parte de los astrocitos (Steiner y col., 2002) y células endoteliales (Panetti, 2002).

2.2. *Silver Atomic Quantum Clusters*

Parte de esta tesis está ligada al proyecto CONSOLIDER-NanoBioMed, que conecta disciplinas distintas como la nanotecnología y la biomedicina. El objetivo principal del proyecto es el de encontrar posibles aplicaciones de la nanociencia para la biomedicina. En el marco de este proyecto trabajamos, en colaboración con el laboratorio del Dr. Arturo López-Quintela, con los *Silver Atomic Quantum Clusters* (AgAQC), que son agrupaciones de 2 o 3 átomos de plata que

poseen la propiedad de electrocatalizar la oxidación del etanol en medio ácido, básico y fisiológico. Esta propiedad nos indujo a pensar la posibilidad de que tuvieran la capacidad de paliar los efectos nocivos del etanol en células de mamífero.

Previamente a desarrollar nuestra hipótesis debíamos diseñar un modelo celular en el que ensayar la exposición aguda al etanol y poder cuantificar el daño celular que provocaba el etanol y por parte de las propias AgAQCs si lo hubiese. Para ello utilizamos las células NRK, células epiteliales de riñón de rata en las cuales se podía evaluar perfectamente el efecto del etanol ya que poseen un citoesqueleto de actina muy evidente y una notoria sensibilidad frente al etanol.

Así, las células expuestas a etanol de forma aguda (200 mM, 30 minutos) y AgAQCs (1 μ g/ml) reducían la población de células afectadas por el etanol en cuanto a su morfología. Además, el balance entre actina globular (G-actina) y actina filamentosa (F-actina) (separada mediante fraccionamiento celular), que se veía alterado por una reducción de la F-actina por parte del etanol, se normalizaba en presencia de los AgAQCs. Por último, aquellas células expuestas tanto a etanol como a AgAQCs, presentaban una reducción de la activación de la caspasa-3 respecto a las expuestas solamente a etanol. Paralelamente, el grupo del Dr. López-Quintela observó que la electrooxidación del etanol por parte de los AgAQCs al suceder a pH fisiológico y a concentraciones de etanol similares a las encontradas en sangre de individuos alcoholizados, hecho que apoyaba nuestra hipótesis inicial al considerar las AgAQCs como potenciales agentes terapéuticos contra los efectos citotóxicos del etanol. Esta mitigación al ser específica para alcoholes primarios y no otros agentes citotóxicos nos indicaba que realmente la prevención de los efectos citotóxicos estaba relacionada con la capacidad de electrooxidar alcoholes primarios por parte de los AgAQCs. La evidencia que confirmaba que los AgAQCs eran capaces de mitigar los efectos del etanol a través de sus propiedades catalíticas era la determinación de etanol en el medio de cultivo. Aquellas células expuestas a etanol y AgAQCs, mostraban una disminución de la concentración de etanol, respecto a expuestas solamente a etanol, debido a la acción catalítica de los AgAQCs en la oxidación del etanol.

Otra cuestión que nos planteamos era el papel jugaban las células en la electrocatálisis del etanol, ya que los resultados nos indicaron que tal disminución solamente ocurría en presencia de las células. El motivo podía radicar en que el potencial eléctrico necesario para llevar a cabo la electrooxidación era otorgado por la membrana plasmática de las células. Hecho bastante probable ya que los potenciales necesarios para la electrooxidación eran potenciales eléctricos bajos, similares a los que se dan en las membranas celulares de célula no excitables. Los potenciales necesarios para electroreducir el H_2O_2 estaban demasiado alejados de aquellos

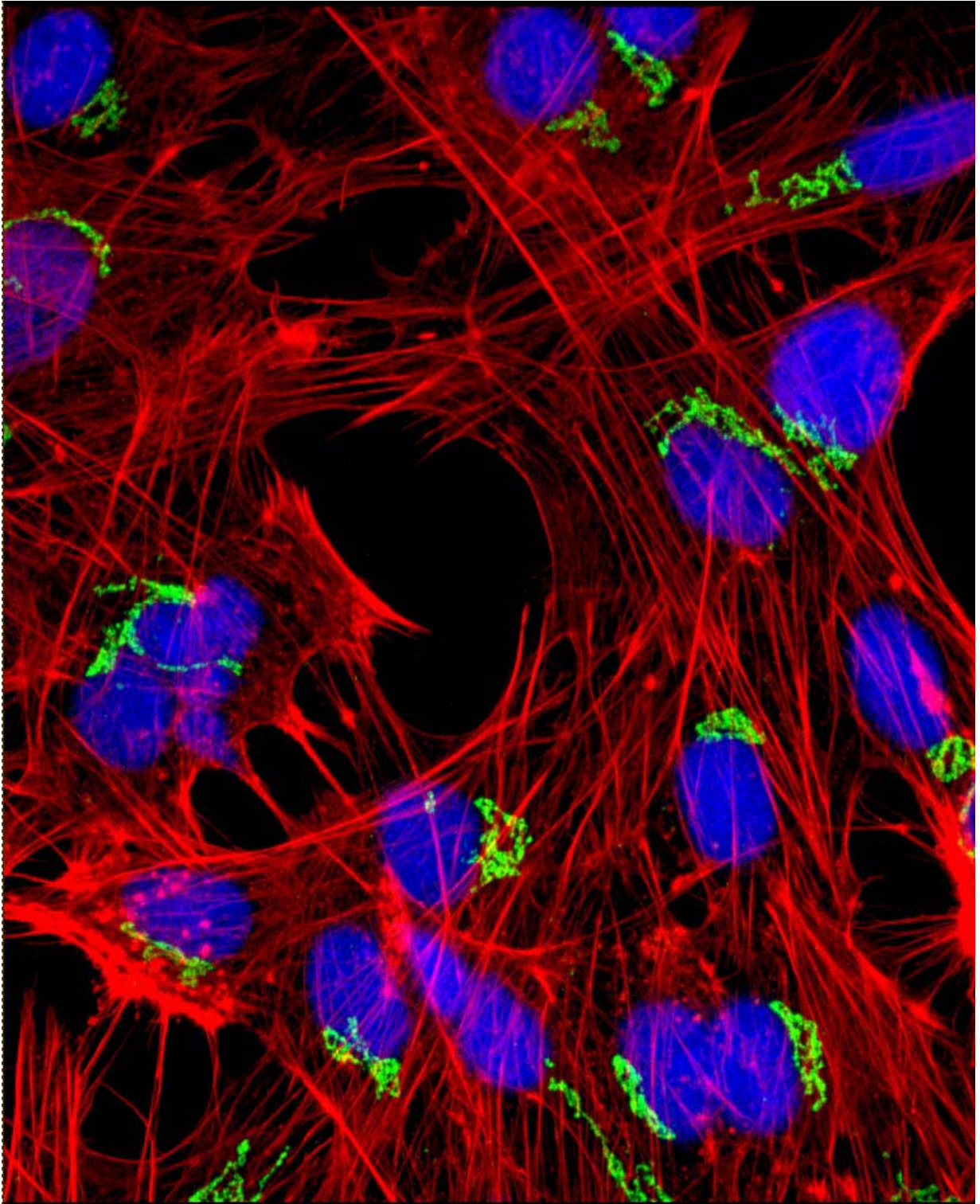
que podían proporcionar la membrana plasmática, razón por la cual probablemente no eran capaces de electroreducirla.

La localización subcelular en la cual los AgAQCs electrooxidaban el etanol, debía ser supuestamente alrededor de la membrana, para aprovechar el potencial eléctrico de esta. Metodológicamente esta cuestión fue inabordable, debido al tamaño de los AgAQCs. También, los AgAQCs también eran capaces de emitir fluorescencia pero las dosis utilizadas en los experimentos celulares eran demasiado bajas para su detección mediante fluorimetría. No obstante, en trabajos previos del Dr. Quintela se observó que gracias a su estructura plana los AgAQCs tendían a localizarse en las interfases de modelos de membranas artificiales, como películas de surfactantes en microemulsiones (Ledo-Suárez y col., 2007). Por lo tanto, suponemos que una vez diluidas en el medio de cultivo, los AgAQCs se intercalan en la membrana plasmática electrooxidando parte del etanol que atraviese la membrana, mitigando así los efectos nocivos del etanol en las células.

Un punto interesante a abordar en un futuro, es el de conocer los productos que generan los AgAQCs al electrooxidar el etanol para determinarlos en el medio de cultivo y así corroborar la actividad electrocatalítica de los AgAQCs.

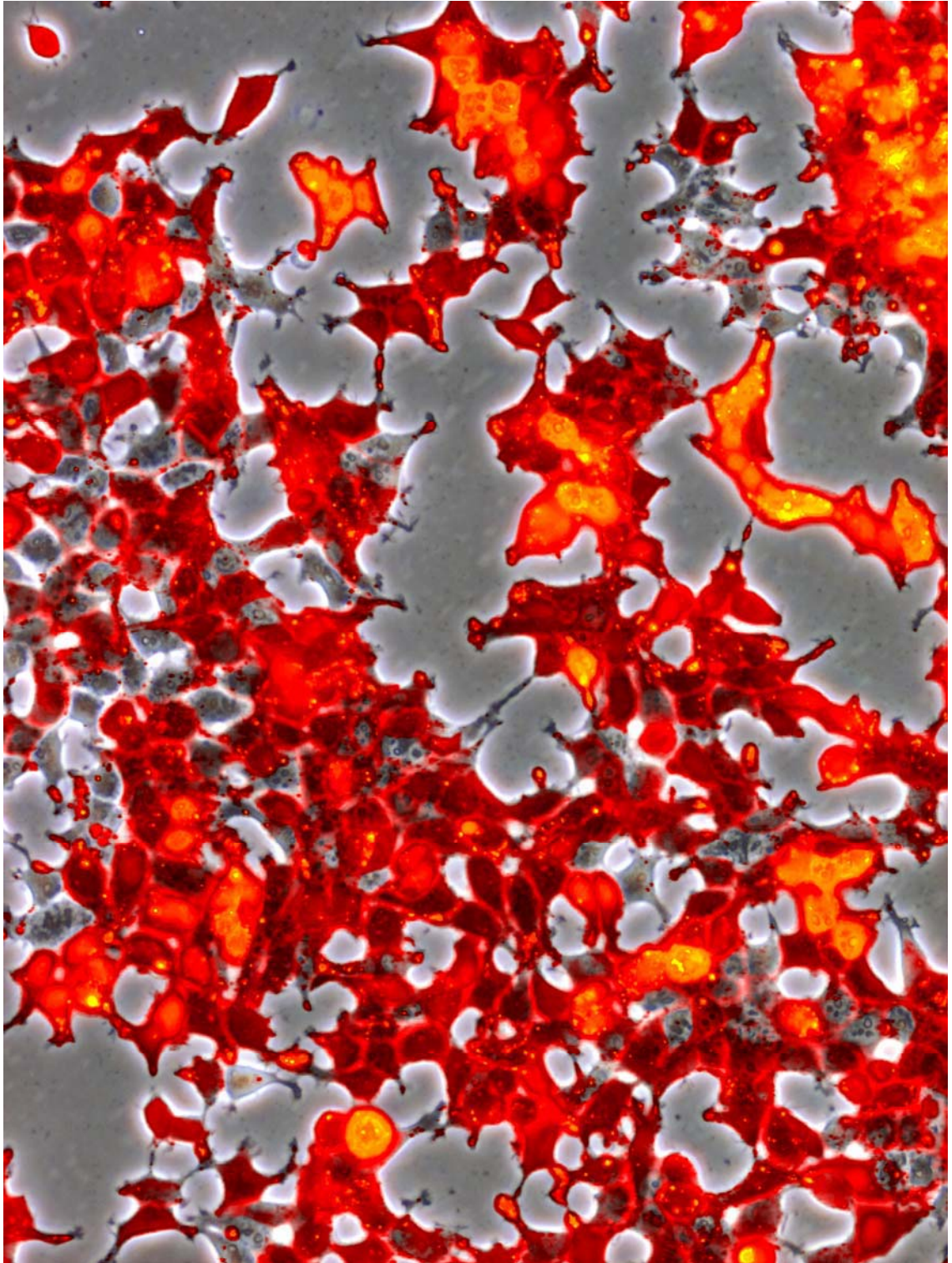
Por lo tanto, pensamos que los AgAQCs actuarían como una enzima de membrana capaz de catalizar un sustrato utilizando el potencial eléctrico proporcionado por la célula (Cracknell y col., 2008). Planteando así, un concepto nuevo que consistiría en considerar a la célula como un electrodo, abriendo la puerta a la aplicabilidad en el campo de la biomedicina a todo un conjunto de materiales nanoscópicos con capacidades electrocatalizadoras capaces de participar en procesos biológicos (Herzing y col., 2008; Turner y col., 2008).

Por último en nuestro modelo *in vitro* de DRAF, cultivos primarios de astrocitos, también observamos mitigación de los efectos nocivos del etanol, lo cual fortalece la posibilidad de que los AgAQCs puedan ser utilizados en un futuro como farmacoterapia contra los DRAF. Sin embargo, somos conscientes de que la potencial aplicabilidad de los AgAQCs es algo prematuro e hipotético. Para demostrarlo deberían evaluarse más ampliamente los efectos citotóxicos en cultivos celulares, y observar qué efectividad y toxicidad presentan en modelos animales a corto y largo plazo. A todo ello, debemos añadirle las dificultades intrínsecas (explicadas en el 1.3 de la introducción) para alcanzar las fases clínicas de una potencial farmacoterapia contra los DRAF. De todas formas, diversos estudios están realizando grandes progresos en esta nueva disciplina, la nanobiomedicina, y gradualmente se van observando los resultados. Un ejemplo es el caso de los nanotubos, capaces de mejorar la comunicación entre neuronas gracias a sus propiedades electrocatalíticas (Malarkey y Parpura, 2007; Cellot y col., 2009).



V. - CONCLUSIONES

1. La reorganización del citoesqueleto de actina en modelos celulares expuestos crónicamente a etanol viene dado por una disminución de los niveles de RhoA-GTP.
2. La disminución de los niveles de RhoA-GTP producido por el etanol está causado por un aumento de la actividad RhoGAP y cuyo principal responsable son las p190RhoGAPs.
3. El etanol también provoca una disminución de los niveles de fosfoinosítidos, lo que contribuye entre otros, a una alteración en el citoesqueleto de actina.
4. Tanto el ácido lisofosfatídico (LPA) como agrupaciones de 2 o 3 átomos de plata (AgAQCs) son capaces de proteger a las células frente al etanol. El primero lo hace a través de la vía RhoA/ROCK y el segundo probablemente mediante una reacción electrocatalítica sobre el alcohol a nivel de la membrana plasmática aprovechando su potencial de membrana.



VI. - BIBLIOGRAFÍA

- A**bbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 41-53.
- Abel EL. Maternal alcohol consumption and spontaneous abortion. *Alcohol Alcohol.* 1997; 32: 211-219.
- Adamson P, Paterson HF, Hall A. Intracellular-Localization of the p21(Rho) Proteins. *J Cell Biol.* 1992; 119: 617-627.
- Addolorato G, Gasbarrini A, Marcocchia S, Simoncini M, Baccarini P, Vagni G, Grieco A, Sbriccoli A, Granato A, Stefanini GF, Gasbarrini G. Prenatal exposure to ethanol in rats: effects on liver energy level and antioxidant status in mothers, fetuses, and newborns. *Alcohol.* 1997; 14: 569-573.
- Aguda AH, Burtnick LD, Robinson RC. The state of the filament. *EMBO Rep.* 2005; 6: 220-226.
- Ahuja R, Pinyol R, Reichenbach N, Custer L, Klingensmith J, Kessels MM, Qualmann B. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell.* 2007; 131: 337-350.
- Aikawa Y, Martin TF. ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *J Cell Biol.* 2003; 162: 647-659.
- Alati R, Al Mamun A, Williams GM, O'Callaghan M, Najman JM, Bor W. In utero alcohol exposure and prediction of alcohol disorders in early adulthood: a birth cohort study. *Arch Gen Psychiatry.* 2006; 63: 1009-1016.
- Albertsen K, Andersen AM, Olsen J, Grønbaek M. Alcohol consumption during pregnancy and the risk of preterm delivery. *Am J Epidemiol.* 2004; 159: 155-161.
- Allen NJ, Barres BA. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; 15: 542-548.
- Altura BM, Altura BT, Carella A, Chatterjee M, Halevy S, Tejani N. Alcohol produces spasms of human umbilical blood vessels: relationship to fetal alcohol syndrome (FAS). *Eur J Pharmacol.* 1982; 86: 311-312.
- Amano M, Chihara K, Kimura K, Fukata Y, Nakamura N, Matsuura Y, Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science.* 1997; 275: 1308-1311.
- American Academy of Pediatrics. Committee on Substance Abuse and Committee on Children with Disabilities. Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders. *Pediatrics.* 2000; 106: 358-361
- Anderson P, Baumberg B. *Alcohol in Europe.* London: Institute of Alcohol Studies, 2006.
- Anji A, Kumari M. A novel RNA binding protein that interacts with NMDA R1 mRNA: regulation by ethanol. *Eur J Neurosci.* 2006; 23: 2339-2350.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 208-15.

Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst A, Riley EP, Mattson SN, Jernigan TL. Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev Med Child Neurol.* 2001; 43: 148-154.

Auld DS, Robitaille R. Glial cells and neurotransmission: an inclusive view of synaptic function. *Neuron.* 2003; 40: 389-400.

Autti-Rämö I, Autti T, Korkman M, Kettunen S, Salonen O, Valanne L. MRI findings in children with school problems who had been exposed prenatally to alcohol. *Dev Med Child Neurol.* 2002; 44: 98-106.

Barberis D, Casazza A, Sordella R, Corso S, Artigiani S, Settleman J, Comoglio PM, Tamagnone L. p190 Rho-GTPase activating protein associates with plexins and it is required for semaphorin signalling. *J Cell Sci.* 2005; 118: 4689-4700.

Barclay DC, Hallbergson AF, Montague JR, Mudd LM. Reversal of ethanol toxicity in embryonic neurons with growth factors and estrogen. *Brain Res Bull.* 2005; 67: 459-465.

Barr HM, Streissguth AP. Identifying maternal self-reported alcohol use associated with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001; 25: 283-287.

Bazan NG. Synaptic lipid signaling: significance of polyunsaturated fatty acids and platelet-activating factor. *J Lipid Res.* 2003; 44: 2221-2233.

Bearer CF, Swick AR, O'Riordan MA, Cheng G. Ethanol inhibits L1-mediated neurite outgrowth in postnatal rat cerebellar granule cells. *Biol Chem.* 1999; 274: 13264-13270.

Bearer CF. Markers to detect drinking during pregnancy. *Alcohol Res Health.* 2001; 25: 210-208.

Bearer CF, Stoler JM, Cook JD, Carpenter SJ. Biomarkers of alcohol use in pregnancy. *Alcohol Res Health.* 2004; 28: 38-43.

Bezzi P, Volterra A. A neuron-glia signalling network in the active brain. *Curr Opin Neurobiol.* 2001; 11: 387-394.

Bhatara VS, Lovrein F, Kirkeby J, Swayze V, Unruh E, Johnson V. Brain function in fetal alcohol syndrome assessed by single photon emission computed tomography. *S D J Med.* 2002; 55: 59-62.

Bhave SV, Hoffman PL. Ethanol promotes apoptosis in cerebellar granule cells by inhibiting the trophic effect of NMDA. *J Neurochem.* 1997; 68: 578-586.

Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci.* 2009; 3: 1-14.

- Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, Roest Crolius H, Carrié A, Fauchereau F, Cherry M, Briault S, Hamel B, Fryns JP, Beldjord C, Kahn A, Moraine C, Chelly J. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature*. 1998; 392: 923-926.
- Bishop AL, Hall A. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 2000; 348: 241-255.
- Boivin D, Beliveau R. Subcellular-Distribution and Membrane Association of Rho-Related Small Gtp-Binding Proteins in Kidney Cortex. *Am J Physiol Renal Physiol*. 1995; 38: F180-F189.
- Bonthius DJ, Karacay B, Dai D, Hutton A, Pantazis NJ. The NO-cGMP-PKG pathway plays an essential role in the acquisition of ethanol resistance by cerebellar granule neurons. *Neurotoxicol Teratol*. 2004; 26: 47-57.
- Bookstein FL, Streissguth AP, Sampson PD, Connor PD, Barr HM. Corpus callosum shape and neuropsychological deficits in adult males with heavy fetal alcohol exposure. *Neuroimage*. 2002; 15: 233-251.
- Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 2007; 129: 865-877.
- Botelho RJ, Teruel M, Dierckman R, Anderson R, Wells A, York JD, Meyer T, Grinstein S. Localized biphasic changes in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate at sites of phagocytosis. *J Cell Biol*. 2000; 151: 1353-1368.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The Gtpase Superfamily - Conserved Structure and Molecular Mechanism. *Nature*. 1991; 349: 117-127.
- Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 37-53.
- Bradley KA, Badrinath S, Bush K, Boyd-Wickizer J, Anawalt B. Medical risks for women who drink alcohol. *J Gen Intern Med*. 1998; 13: 627-639.
- Bradley WD, Hernández SE, Settleman J, Koleske AJ. Integrin signaling through Arg activates p190RhoGAP by promoting its binding to p120RasGAP and recruitment to the membrane. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 4827-4836.
- Braza-Boïls A, Tomás M, Marín MP, Megías L, Sancho-Tello M, Fornas E, Renau-Piqueras J. Glycosylation is altered by ethanol in rat hippocampal cultured neurons. *Alcohol Alcohol*. 2006; 41: 494-504.
- Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT, Settleman J. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development*. 2000; 127: 4891-4903.
- Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol*. 2001; 3, 361-367.

- Brown M, Jacobs T, Eickholt B, Ferrari G, Teo M, Monfries C, Qi RZ, Leung T, Lim L, Hall C. Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J Neurosci.* 2004; 24: 8994-9004.
- Buschbaum RJ. Rho activation at a glance. *J Cell Sci.* 2007; 120: 1149-1152.
- Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provide a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell.* 1999; 10: 819-832.
- Burton GW, Ingold KU. beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science.* 1984; 224: 569-573.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002; 22: 183-192.
- Butt AM, Colquhoun K, Berry M. Confocal imaging of glial cells in the intact rat optic nerve. *Glia.* 1994; 10: 315-322.
- Butt AM, Duncan A, Berry M. Astrocyte associations with nodes of Ranvier: ultrastructural analysis of HRP-filled astrocytes in the mouse optic nerve. *J Neurocytol.* 1994; 23: 486-499.

-
- C**ampbell K, Götz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 2002; 25: 235-238.
- Carlier MF, Pantaloni D. Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol.* 1997; 269: 459-467.
- Carter JJ, Tong M, Silbermann E, Lahousse SA, Ding FF, Longato L, Roper N, Wands JR, de la Monte SM. Ethanol impaired neuronal migration is associated with reduced aspartyl-asparaginyl-beta-hydroxylase expression. *Acta Neuropathol.* 2008; 116: 303-315.
- Ceccanti M, Alessandra Spagnolo P, Tarani L, Luisa Attilia M, Chessa L, Mancinelli R, Stegagno M, Francesco Sasso G, Romeo M, Jones KL, Robinson LK, Del Campo M, Phillip Gossage J, May PA, Eugene Hoyme H. Clinical delineation of fetal alcohol spectrum disorders (FASD) in Italian children: comparison and contrast with other racial/ethnic groups and implications for diagnosis and prevention. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31: 270-277.
- Cellot G, Cilia E, Cipollone S, Rancic V, Sucapane A, Giordani S, Gambazzi L, Markram H, Grandolfo M, Scaini D, Gelain F, Casalis L, Prato M, Giugliano M, Ballerini L. Carbon nanotubes might improve neuronal performance by favouring electrical shortcuts. *Nat Nanotechnol.* 2009; 4: 126-133.
- Cerione RA, Zheng Y. The Dbl family of oncogenes. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 8: 216-22.
- Chao TI, Rickmann M, Wolff JR. The synapse-astrocyte boundary: an anatomical basis for an integrative role of glia in synaptic transmission. In: Volterra A, Magistretti PJ, Haydon PG, editors. *The Tripartite Synapse: Glia in synaptic transmission.* Great Britain: Oxford University Press; 2002. p. 3-23.

- Chardin P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 54-62.
- Chatah NE, Abrams CS. G-protein-coupled receptor activation induces the membrane translocation and activation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase I alpha by a Rac- and Rho-dependent pathway. *J Biol Chem.* 2001; 276: 34059-3465.
- Chen H, Bernstein BW, Bamburg JR. Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25: 19-23.
- Chen SY, Sulik KK. Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20: 1071-1076.
- Chen SY, Sulik KK. Iron-mediated free radical injury in ethanol-exposed mouse neural crest cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294: 134-140.
- Chen SY, Wilkemeyer MF, Sulik KK, Charness ME. Octanol antagonism of ethanol teratogenesis. *FASEB J.* 2001; 15: 1649-1651.
- Chong ZZ, Lin SH, Maiese K. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J Vasc Res.* 2002; 39: 131-147.
- Church MW, Gerkin KP. Hearing disorders in children with fetal alcohol syndrome: findings from case reports. *Pediatrics.* 1988; 82: 147-154.
- Clark CM, Li D, Conry J, Conry R, Loock C. Structural and functional brain integrity of fetal alcohol syndrome in nonretarded cases. *Pediatrics.* 2000; 105: 1096-1099.
- Clark EA, King WG, Brugge JS, Symons M, Hynes RO. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol.* 1998; 142: 573-586.
- Clarren SK, Bowden DM. Fetal alcohol syndrome: a new primate model for binge drinking and its relevance to human ethanol teratogenesis. *J Pediatr.* 1982; 101: 819-824.
- Coffin JM, Baroody S, Schneider K, O'Neill J. Impaired cerebellar learning in children with prenatal alcohol exposure: a comparative study of eyeblink conditioning in children with ADHD and dyslexia. *Cortex.* 2005; 41: 389-398.
- Cohen MM Jr, Sulik KK. Perspectives on holoprosencephaly: Part II. Central nervous system, craniofacial anatomy, syndrome commentary, diagnostic approach, and experimental studies. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1992; 12: 196-244.
- Cohen-Kerem R, Koren G. Antioxidants and fetal protection against ethanol teratogenicity. I. Review of the experimental data and implications to humans. *Neurotoxicol Teratol.* 2003; 25: 1-9.
- Coles CD, Platzman KA, Lynch ME, Freides D. Auditory and visual sustained attention in adolescents prenatally exposed to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26: 263-271.
- Colombo JA, Yáñez A, Puissant V, Lipina S. Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys. *J Neurosci Res.* 1995; 40: 551-556.

- Colombo JA, Napp MI, Yáñez A, Reisin H. Tissue printing of astroglial interlaminar processes from human and non-human primate cerebral cortex. *Brain Res Bull.* 2001; 55: 561-565.
- Cooper JA, Schafer DA. Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12: 97-103.
- Coppolino MG, Dierckman R, Loijens J, Collins RF, Pouladi M, Jongstra-Bilen J, Schreiber AD, Trimble WS, Anderson R, Grinstein S. Inhibition of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase α impairs localized actin remodeling and suppresses phagocytosis. *J Biol Chem.* 2002; 277: 43849-43857.
- Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell.* 1995; 81: 1137-1146.
- Cox D, Berg JS, Cammer M, Chingwundoh JO, Dale BM, Cheney RE, Greenberg S. Myosin X is a downstream effector of PI(3)K during phagocytosis. *Nat Cell Biol.* 2002; 4: 469-477.
- Cozier GE, Carlton J, Bouyoucef D, Cullen PJ. Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004; 282: 49-88.
- Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK. Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 173-179.
- Cracknell JA, Vincent KA, Armstrong FA. Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis. *Chem Rev.* 2008; 108: 2439-2461.
- Cremona O, Di Paolo G, Wenk MR, Lüthi A, Kim WT, Takei K, Daniell L, Nemoto Y, Shears SB, Flavell RA, McCormick DA, De Camilli P. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell.* 1999; 99: 179-88.
- Cudd TA. Animal model systems for the study of alcohol teratology. *Exp Biol Med.* 2005; 230: 389-393.
- Cui SJ, Tewari M, Schneider T, Rubin R. Ethanol promotes cell death by inhibition of the insulin-like growth factor I receptor. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 1121-1127.
- Czech MP. Dynamics of phosphoinositides in membrane retrieval and insertion. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65: 791-815.

-
- D**'Angelo G, Vicinanza M, Di Campli A, De Matteis MA. The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci.* 2008; 121: 1955-1963.
- de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol.* 1990; 111: 1069-1079.
- de Pina AS, Langford GM. Vesicle transport: The role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech.* 1999; 47: 93-106.

- de Reuck J, Vanderdonck P. Choroid plexus and ependymal cells in CSF cytology. *Clin Neurol Neurosurg.* 1986; 88: 177-179.
- Defacque H, Egeberg M, Habermann A, Diakonova M, Roy C, Mangeat P, Voelter W, Marriott G, Pfannstiel J, Faulstich H, Griffiths G. Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *EMBO J.* 2000; 19: 199-212.
- Deitmer JW, Verkhratsky AJ, Lohr C. Calcium signalling in glial cells. *Cell Calcium.* 1998; 24: 405-416.
- DeJonge MH, Zachman RD. The effect of maternal ethanol ingestion on fetal rat heart vitamin A: a model for fetal alcohol syndrome. *Pediatr Res.* 1995; 37: 418-423.
- Deltour L, Ang HL, Duester G. Ethanol inhibition of retinoic acid synthesis as a potential mechanism for fetal alcohol syndrome. *FASEB J.* 1996; 10: 1050-1057.
- Der CJ, Balch WE. Cell biology - GTPase traffic control. *Nature.* 2000; 405: 749-752.
- Der C, editor. Ras Family GTPases. *Proteins and Cell Regulation, Vol. 4.* Dordrecht: Springer; 2006.
- DerMardirossian C, Bokoch GM. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 2005; 15: 356-363.
- Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1778: 1591-600.
- Di Paolo G, Moskowitz HS, Gipson K, Wenk MR, Voronov S, Obayashi M, Flavell R, Fitzsimonds RM, Ryan TA, De Camilli P. Impaired PtdIns(4,5)P₂ synthesis in nerve terminals produces defects in synaptic vesicle trafficking. *Nature.* 2004; 431: 415-422.
- Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature.* 2006; 443: 651-657.
- Diana G, Valentini G, Travaglione S, Falzano L, Pieri M, Zona C, Meschini S, Fabbri A, Fiorentini C. Enhancement of learning and memory after activation of cerebral Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 636-641.
- Díaz R, Gual A, García M, Arnau J, Pascual F, Cañuelo B, Rubio G, de Dios Y, Fernández-Eire MC, Valdés R, Garbayo I. Children of alcoholics in Spain: from risk to pathology. Results from the ALFIL program. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol.* 2008; 43: 1-10.
- Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004; 45: 1375-1397.
- Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Nemmers B, Olney JW. Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Res Dev Brain Res.* 2005; 155: 1-13.

- Distler C, Dreher Z, Stone J. Contact spacing among astrocytes in the central nervous system: an hypothesis of their structural role. *Glia*. 1991; 4: 484-494.
- Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*. 1979; 3: 79-83.
- Dodd PR, Beckmann AM, Davidson MS, Wilce PA. Glutamate-mediated transmission, alcohol, and alcoholism. *Neurochem Int*. 2000; 37: 509-533.
- Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2003; 6: 1127-1134.
- Dransart E, Olofsson B, Cherfils J. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic*. 2005; 6: 957-966.
- Drenckhahn D, Pollard TD. Elongation of actin filaments is a diffusion-limited reaction at the barbed end and is accelerated by inert macromolecules. *J Biol Chem*. 1986; 261: 12754-12758.
- Druse MJ, Kuo A, Tajuddin N. Effects of in utero ethanol exposure on the developing serotonergic system. *Alcohol Clin Exp Res*. 1991; 15: 678-684.
- Duex JE, Nau JJ, Kauffman EJ, Weisman LS. Phosphoinositide 5-phosphatase Fig 4p is required for both acute rise and subsequent fall in stress-induced phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate levels. *Eukaryot Cell*. 2006; 5: 723-731.

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

Endres M, Toso L, Roberson R, Park J, Abebe D, Poggi S, Spong CY. Prevention of alcohol-induced developmental delays and learning abnormalities in a model of fetal alcohol syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 193: 1028-1034.

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein. GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000; 25: 1439-1451.

Engel J, Fasold H, Hulla FW, Waechter F, Wegner A. Polymerization Reaction of Muscle Actin. *Mol Cell Biochem*. 1977; 18: 3-13.

Erickson JW, Zhang C, Kahn RA, Evans T, Cerione RA. Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 1996; 271: 26850-26854.

Erickson JW, Cerione RA. 2004, Structural elements, mechanism, and evolutionary convergence of Rho protein-guanine nucleotide exchange factor complexes. *Biochemistry*. 2004; 43: 837-842.

Eriksen JL, Druse MJ. Astrocyte-mediated trophic support of developing serotonin neurons: effects of ethanol, buspirone, and S100B. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001; 131: 9-15.

- Eriksen JL, Gillespie R, Druse MJ. Effects of ethanol and 5-HT_{1A} agonists on astroglial S100B. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002; 139: 97-105.
- Ernhart CB, Sokol RJ, Martier S, Moron P, Nadler D, Ager JW, Wolf A. Alcohol teratogenicity in the human: a detailed assessment of specificity, critical period, and threshold. *Am J Obstet Gynecol.* 1987; 156: 33-39.
- Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002; 420:629-635.
- Evangelista M, Zigmond S, Boone C. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.* 2003; 116: 2603-2611.
- Exton JH. Regulation of phospholipase D. *FEBS Lett.* 2002; 531: 58-61.

-
- F**agerlund A, Heikkinen S, Autti-Rämö I, Korkman M, Timonen M, Kuusi T, Riley EP, Lundbom N. Brain metabolic alterations in adolescents and young adults with fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30: 2097-2104.
- Fagotti A, Di RI, Simoncelli F, Chaponnier C, Gabbiani G, Pascolini R. Actin isoforms in amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *Cell Tissue Res.* 1998 292, 173-176.
- Fauchereau F, Herbrand U, Chafey P, Eberth A, Koulakoff A, Vinet MC, Ahmadian MR, Chelly J, Billuart P. The RhoGAP activity of OPHN1, a new F-actin-binding protein, is negatively controlled by its amino-terminal domain. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 23: 574-586.
- Fischer RS, Fowler VM. Tropomodulins: life at the slow end. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 593-601.
- Fleming IN, Elliott CM, Exton JH. Differential translocation of Rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem.* 1996; 271: 33067-33073.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature.* 2002; 419: 361-366.
- Fryer SL, McGee CL, Matt GE, Riley EP, Mattson SN. Evaluation of psychopathological conditions in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Pediatrics.* 2007; 119: 733-741.
- Fryer SL, Tapert SF, Mattson SN, Paulus MP, Spadoni AD, Riley EP. Prenatal alcohol exposure affects frontal-striatal BOLD response during inhibitory control. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007; 31: 1415-1424.
- Fucini RV, Chen JL, Sharma C, Kessels MM, Stamnes M. Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 621-631.

-
- G**arbay B, Heape AM, Sargueil F, Cassagne C. Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol.* 2000; 61: 267-304.

- Gassama-Diagne A, Yu W, ter Beest M, Martin-Belmonte F, Kierbel A, Engel J, Mostov. Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 963-970.
- Ge Y, Belcher SM, Light KE. Alterations of cerebellar mRNA specific for BDNF, p75NTR, and TrkB receptor isoforms occur within hours of ethanol administration to 4-day-old rat pups. *Brain Res Dev Brain Res.* 2004; 151: 99-109.
- Gilmore AP, Burridge K. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature.* 1996; 381: 531-535.
- Goldman S. Glia as neural progenitor cells. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 590-596.
- Goodlett CR, Lundahl KR. Temporal determinants of neonatal alcohol-induced cerebellar damage and motor performance deficits. *Pharmacol Biochem Behav.* 1996; 55: 531-540.
- Gorvel JP, Chang TC, Boretto J, Azuma T, Chavrier P. Differential properties of D4/LyGDI versus RhoGDI: phosphorylation and rho GTPase selectivity. *FEBS Lett.* 1998; 422: 269-273.
- Gosser YQ, Nomanbhoy TK, Aghazadeh B, Manor D, Combs C, Cerione RA, Rosen MK. C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature.* 1997; 387: 814-819.
- Gourley SL, Koleske AJ, Taylor JR. Loss of dendrite stabilization by the Abl-related gene (Arg) kinase regulates behavioral flexibility and sensitivity to cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009; 106: 16859-16864.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev.* 2005; 19: 1-49.
- Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119: 89-105.
- Gressens P, Lammens M, Picard JJ, Evrard P. Ethanol-induced disturbances of gliogenesis and neuronogenesis in the developing murine brain: an in vitro and in vivo immunohistochemical and ultrastructural study. *Alcohol Alcohol.* 1992; 27: 219-226.
- Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhatsky A, Reichenbach A, Kettenmann H. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nat Neurosci.* 1999; 2: 139-143.
- Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J Neurosci Res.* 2002; 68: 138-149.
- Grumet M. Structure, expression, and function of Ng-CAM, a member of the immunoglobulin superfamily involved in neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *J Neurosci Res.* 1992; 31: 1-13.
- Guerri C, Renau-Piqueras J. Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol.* 1997; 15: 65-81.

Guerri C, Bazinet A, Riley EP. Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44: 108-114.

Habets GG, van der Kammen RA, Stam JC, Michiels F, Collard JG. Sequence of the human invasion-inducing TIAM1 gene, its conservation in evolution and its expression in tumor cell lines of different tissue origin. *Oncogene*. 1995; 10: 1371-1376.

Hagelberg C, Allan D. Restricted diffusion of integral membrane proteins and polyphosphoinositides leads to their depletion in microvesicles released from human erythrocytes. *Biochem J*. 1990; 271: 831-834.

Halassa MM, Haydon PG. Integrated brain circuits: astrocytic networks modulate neuronal activity and behavior. *Annu Rev Physiol*. 2010; 72: 335-355.

Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998; 279: 509-514.

Hallak H, Seiler AE, Green JS, Henderson A, Ross BN, Rubin R. Inhibition of insulin-like growth factor-I signaling by ethanol in neuronal cells. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001; 25: 1058-1064.

Han J, Luby-Phelps K, Das B, Shu X, Xia Y, Mosteller RD, Krishna UM, Falck JR, White MA, Broek D. Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science*. 1998; 279: 558-560.

Harper C. The neurotoxicity of alcohol. *Hum Exp Toxicol*. 2007; 26: 251-257.

Harris RA, Proctor WR, McQuilkin SJ, Klein RL, Mascia MP, Whatley V, Whiting PJ, Dunwiddie TV. Ethanol increases GABAA responses in cells stably transfected with receptor subunits. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 226-232.

Harris ES, Higgs HN. Actin cytoskeleton: Formins lead the way. *Curr Biol*. 2004; 14: R520-R522.

Harwood AJ. Lithium and bipolar mood disorder: the inositol-depletion hypothesis revisited. *Mol Psychiatry*. 2005; 10: 117-126.

He J, Nixon K, Shetty AK, Crews FT. Chronic alcohol exposure reduces hippocampal neurogenesis and dendritic growth of newborn neurons. *Eur J Neurosci*. 2005; 21: 2711-2720.

Hehnlly H, Sheff D, Stamnes M. Shiga toxin facilitates its retrograde transport by modifying microtubule dynamics. *Mol Biol Cell*. 2006; 17: 4379-4389.

Henderson GI, Devi BG, Perez A, Schenker S. In utero ethanol exposure elicits oxidative stress in the rat fetus. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 714-720.

Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front Biosci*. 1999; 4: D541-550.

Hernández SE, Settleman J, Koleske AJ. Adhesion-dependent regulation of p190RhoGAP in the developing brain by the Abl-related gene tyrosine kinase. *Curr. Biol*. 2004; 14: 691-696.

- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* 1999; 57: 417-428.
- Herzing AA, Kiely CJ, Carley AF, Landon P, Hutchings GJ. Identification of active gold nanoclusters on iron oxide supports for CO oxidation. *Science.* 2008; 321: 1331-1335.
- Hirsch E, Braccini L, Ciraolo E, Morello F, Perino A. Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem Sci.* 2009; 34: 244-248.
- Holmes KC, Popp D, Gebhard W, Kabsch W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990; 347: 44-49.
- Holownia A, Ledig M, Mapoles J, Ménez JF. Acetaldehyde-induced growth inhibition in cultured rat astroglial cells. *Alcohol.* 1996; 13: 93-97.
- Horner PJ, Palmer TD. New roles for astrocytes: the nightlife of an 'astrocyte'. *La vida loca! Trends Neurosci.* 2003; 26: 597-603.
- Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 2006; 173: 383-394.
- Howell KK, Lynch ME, Platzman KA, Smith GH, Coles CD. Prenatal alcohol exposure and ability, academic achievement, and school functioning in adolescence: a longitudinal follow-up. *J Pediatr Psychol.* 2006; 31: 116-126.
- Hu IC, Singh SP, Snyder AK. Effects of ethanol on glucose transporter expression in cultured hippocampal neurons. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995; 19: 1398-1402.

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

Ieraci A, Herrera DG. Nicotinamide protects against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing mouse brain. *PLoS Med.* 2006; 3: e101.

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

Irvine RF. Nuclear lipid signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 349-360.

Jacobs T, Hall C. Rho GTPases - Regulators of Rho GTPases and More. In: Manser Ed, editor. *Rho Family GTPases.* 2005. Dordrecht: Springer; Vol. 3, p. 93-112.

Jaffe AB, Hall A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 247-269.

Janetopoulos C, Devreotes P. Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J Cell Biol.* 2006; 174: 485-490.

- Jenna S, Hussain NK, Danek EI, Triki I, Wasiak S, McPherson PS, Lamarche-Vane N. The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem.* 2002; 277: 6366-6373.
- Johnson VP, Swayze VW, Sato Y, Andreasen NC. Fetal alcohol syndrome: craniofacial and central nervous system manifestations. *Am J Med Genet.* 1996; 61: 329-339.
- Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995; 6: 368-422.
- Jones AW, Sternebring B. Kinetics of ethanol and methanol in alcoholics during detoxification. *Alcohol Alcohol.* 1992; 27: 641-647.
- Jones DR, Sanjuan MA, Mérida I. Type I alpha phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase is a putative target for increased intracellular phosphatidic acid. *FEBS Lett.* 2000; 476: 160-165.
- Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet.* 1973; 302: 999-1001
- Joshi S, Guleria RS, Pan J, Bayless KJ, Davis GE, Dipette D, Singh US. Ethanol impairs Rho GTPase signaling and differentiation of cerebellar granule neurons in a rodent model of fetal alcohol syndrome. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63: 2859-2870.
- Jou TS, Leung SM, Fung LM, Ruiz WG, Nelson WJ, Apodaca G. Selective alterations in biosynthetic and endocytic protein traffic in Madin-Darby canine kidney epithelial cells expressing mutants of the small GTPase Rac1. *Mol Biol Cell.* 2000; 11: 287-304.

Kanaho Y, Suzuki T. Phosphoinositide kinases as enzymes that produce versatile signaling lipids, phosphoinositides. *J Biochem.* 2002; 131: 503-509.

- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of Neural Science.* 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2000.
- Karnoub AE, Der CJ. Rho family GTPases and cellular transformation. In: Marc Symons, editor. *Signal Transduction: RhoGTPases.* 2003. Georgetown: Landes Biosciences; pp 165-186.
- Kerkhoff E, Simpson JC, Leberfinger CB, Otto IM, Doerks T, Bork P, Rapp UR, Raabe T, Pepperkok R. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol.* 2001; 11: 1963-1968.
- Kerkhoff E. Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 477-483.
- Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia.* 2nd edition. Great Britain: Oxford University Press; 2005.
- Kilburn BA, Chiang PJ, Wang J, Flentke GR, Smith SM, Armant DR. Rapid induction of apoptosis in gastrulating mouse embryos by ethanol and its prevention by HB-EGF. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30: 127-134.

- Kimelberg HK. The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int.* 2004; 45: 191-202.
- Kimura KA, Chiu J, Reynolds JN, Brien JF. Effect of chronic prenatal ethanol exposure on nitric oxide synthase I and III proteins in the hippocampus of the near-term fetal guinea pig. *Neurotoxicol Teratol.* 1999; 21: 251-259.
- Klein J. Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J Neurochem.* 2005; 94: 1473-1487.
- Klintsova AY, Scamra C, Hoffman M, Napper RM, Goodlett CR, Greenough WT. Therapeutic effects of complex motor training on motor performance deficits induced by neonatal binge-like alcohol exposure in rats: II. A quantitative stereological study of synaptic plasticity in female rat cerebellum. *Brain Res.* 2002; 937: 83-93.
- Knaus UG, Heyworth PG, Evans T, Curnutte JT, Bokoch GM. Regulation of Phagocyte Oxygen Radical Production by the Gtp-Binding Protein Rac-2. *Science.* 1991; 254: 1512-1515.
- Kodituwakku PW, Handmaker NS, Cutler SK, Weathersby EK, Handmaker SD. Specific impairments in self-regulation in children exposed to alcohol prenatally. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995; 19: 1558-1564.
- Kofuji P, Newman EA. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 2004; 129: 1045-1056.
- Kovar DR, Pollard TD. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2004; 101: 14725-14730.
- Kovilur S, Jacobson JW, Beach RL, Jeffery WR, Tomlinson CR. Evolution of the chordate muscle actin gene. *J Mol Evol.* 1993; 36: 361-368.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The Ras-Related Protein Cdc42Hs and Bradykinin Promote Formation of Peripheral Actin Microspikes and Filopodia in Swiss 3T3 Fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 1942-1952.
- Kozma R, Ahmed S, Best A, Lim L. The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 5069-5080.
- Kranenburg, O, Poland M, Gebbink M, Oomen L, Moolenaar WH. Dissociation of LPA-induced cytoskeletal contraction from stress fiber formation by differential localization of RhoA. *J Cell Sci* 1997; 110: 2417-2427.
- Kraynov VS, Chamberlain C, Bokoch GM, Schwartz MA, Slabaugh S, Hahn KM. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science.* 2000; 290: 333-337.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009; 32: 149-184.

- L**a Grange L, Wang M, Watkins R, Ortiz D, Sanchez ME, Konst J, Lee C, Reyes E. Protective effects of the flavonoid mixture, silymarin, on fetal rat brain and liver. *J Ethnopharmacol.* 1999; 65: 53-61.
- Lamprecht R, Farb CR, LeDoux JE. Fear memory formation involves p190 RhoGAP and ROCK proteins through a GRB2-mediated complex. *Neuron.* 2002; 36: 727-738
- Ledo-Suárez A, Rivas J, Rodríguez-Abreu CF, Rodríguez MJ, Pastor E, Hernández-Creus A, Oseroff SB, López-Quintela MA. Facile synthesis of stable subnanosized silver clusters in microemulsions. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2007; 46: 8823-8827.
- Lelias JM, Adra CN, Wulf GM, Guillemot JC, Khagad M, Caput D, Lim B cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 1479-1483.
- Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J.* 2000; 350: 1-18.
- Lemmon MA. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 99-111.
- Leo MA, Lieber CS. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69: 1071-1085.
- Lévay M, Settleman J, Ligeti E. Regulation of the substrate preference of p190RhoGAP by protein kinase C-mediated phosphorylation of a phospholipid binding site. *Biochemistry.* 2009; 48: 8615-8623.
- Levison SW, Goldman JE. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron.* 1993; 10: 201-212.
- Lewis AK, Bridgman PC. Nerve Growth Cone Lamellipodia Contain 2 Populations of Actin-Filaments That Differ in Organization and Polarity. *J Cell Biol.* 1992; 119: 1219-1243.
- Li F, Higgs HN. The mouse formin mDia1 is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol.* 2003; 13: 1335-1340.
- Ligeti E, Dagher MC, Hernández SE, Koleske AJ, Settleman J. (2004) Phospholipids can switch the GTPase substrate preference of a GTPase-activating protein. *J. Biol Chem.* 279, 5055-5058.
- Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between neurons and glia. *Glia.* 2004; 47: 290-298.
- Lin R, Bagrodia S, Cerione R, Manor D. A novel Cdc42Hs mutant induces cellular transformation. *Curr Biol.* 1997; 7: 794-797.
- Lindmo K, Stenmark H. Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases. *J Cell Sci.* 2006; 119: 605-614.

- Lindsley TA, Kerlin AM, Rising LJ. Time-lapse analysis of ethanol's effects on axon growth in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 2003; 147: 191-199.
- Ling K, Schill NJ, Wagoner MP, Sun Y, Anderson RA. Movin' on up: the role of PtdIns(4,5)P(2) in cell migration. *Trends Cell Biol.* 2006; 16: 276-84.
- Lorenz M, Popp D, Holmes KC. Refinement of the F-actin model against X-ray fiber diffraction data by the use of a directed mutation algorithm. *J Mol Biol.* 1993; 234: 826-36.
- Luna A, Matas OB, Martinez-Menarguez JA, Mato E, Duran JM, Ballesta J, Way M, Egea G. Regulation of protein transport from the golgi complex to the endoplasmic reticulum by Cdc42 and N-WASP. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 866-879.
- Luo J, West JR, Pantazis NJ. Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 1108-1120.
- Luo J, Miller MW. Ethanol inhibits basic fibroblast growth factor-mediated proliferation of C6 astrocytoma cells. *J Neurochem.* 1996; 67: 1448-1456.
- Luo J, Miller MW. Platelet-derived growth factor-mediated signal transduction underlying astrocyte proliferation: site of ethanol action. *J. Neurosci.* 1999; 19: 10014-10025.
- Lupton C, Burd L, Harwood R. Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2004; 127: 42-50.
- Luskin MB. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron.* 1993; 11: 173-189.
- Luskin MB, McDermott K. Divergent lineages for oligodendrocytes and astrocytes originating in the neonatal forebrain subventricular zone. *Glia.* 1994; 11: 211-226.
- Lykidis A, Jackson PD, Rock CO, Jackowski S. The role of CDP-diacylglycerol synthetase and phosphatidylinositol synthase activity levels in the regulation of cellular phosphatidylinositol content. *J Biol Chem.* 1997; 272: 33402-33409.

Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J, Pollard TD. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* 1994; 127: 107-115.

Machesky LM, Hall A. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol.* 1997; 138: 913-926.

Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8: 755-765.

Magistretti PJ, Pellerin L. Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News Physiol Sci.* 1999; 14: 177-182.

- Maier SE, Chen W, West JR. The effects of timing and duration of alcohol exposure on development of fetal brain. In: Abel EL (ed). *Fetal Alcohol Syndrome: From Mechanism to Prevention*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1996. p 27-50.
- Malarkey EB, Parpura V. Applications of carbon nanotubes in neurobiology. *Neurodegener Dis*. 2007; 4: 292-299.
- Malisza KL, Allman AA, Shiloff D, Jakobson L, Longstaffe S, Chudley AE. Evaluation of spatial working memory function in children and adults with fetal alcohol spectrum disorders: a functional magnetic resonance imaging study. *Pediatr Res*. 2005; 58: 1150-1157.
- Matas OB, Martínez-Menárguez JA, Egea G. Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 signaling pathway with Golgi membranes. *Traffic*. 2004; 5: 838-846.
- Martínez SE, Egea G. Novel molecular targets for the prevention of fetal alcohol syndrome. *Recent Pat CNS Drug Discov*. 2007; 2: 23-35.
- Martínez SE, Lázaro-Diéguez F, Selva J, Calvo F, Piqueras JR, Crespo P, Claro E, Egea G. Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol. *J. Neurochem*. 2007; 102: 1044-1052.
- Matheson SF, Hu KQ, Brouns MR, Sordella R, VanderHeide JD, Settleman J. Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Dev. Neurosci*. 2006; 28: 538-550.
- Matsudaira P. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem Sci*. 1991; 16: 87-92.
- Mattson SN, Gramling L, Riley EP, Delis DC, Jones KL. Global-local processing in children prenatally exposed to alcohol. *Child Neuropsychology*. 1996; 2: 165-175.
- Mattson SN, Riley EP, Delis DC, Stern C, Jones KL. Verbal learning and memory in children with fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996; 20: 810-816.
- Mattson SN, Riley EP. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998; 22: 279-294.
- Mattson SN, Goodman AM, Caine C, Delis DC, Riley EP. Executive functioning in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999; 23: 1808-1815.
- Mattson SN, Roebuck TM. Acquisition and retention of verbal and nonverbal information in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002; 26: 875-882.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieder FW. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 2001; 294: 1354-1357.
- May PA, Gossage JP. Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res Health*. 2001; 25: 159-167.
- McCarver DG. ADH2 and CYP2E1 genetic polymorphisms: risk factors for alcohol-related birth defects. *Drug Metab Dispos*. 2001; 29: 562-565.

- McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossin WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*. 1996; 379: 353-357.
- Megias L, Guerri C, Fornas E, Azorin I, Bendala E, Sancho-Tello M, Durán JM, Tomás M, Gomez-Lechon MJ, Renau-Piqueras J. Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. *Int J Dev Biol*. 2000; 44: 209-221.
- Mennella J. Alcohol's effect on lactation. *Alcohol Res Health*. 2001; 25: 230-234.
- Michaelson D, Silletti J, Murphy G, D'Eustachio P, Rush M, Philips MR. Differential localization of Rho GTPases in live cells: Regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*. 2001; 152: 111-126.
- Miller MW, Dow-Edwards DL. Structural and metabolic alterations in rat cerebral cortex induced by prenatal exposure to ethanol. *Brain Res*. 1988; 474: 316-326
- Miller MW. Circadian rhythm of cell proliferation in the telencephalic ventricular zone: effect of in utero exposure to ethanol. *Brain Res*. 1992; 595: 17-24.
- Miller MW, Robertson S. Prenatal exposure to ethanol alters the postnatal development and transformation of radial glia to astrocytes in the cortex. *J Comp Neurol*. 1993; 337: 253-266.
- Miller MW. Effect of pre- or postnatal exposure to ethanol on the total number of neurons in the principal sensory nucleus of the trigeminal nerve: cell proliferation and neuronal death. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 1359-1363.
- Miller MW. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 1995; 19: 1500-1509.
- Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 582-591.
- Milosevic A, Goldman JE. Progenitors in the postnatal cerebellar white matter are antigenically heterogeneous. *J Comp Neurol*. 2002; 452: 192-203.
- Milosevic I, Sørensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E. Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci*. 2005; 25: 2557-2565.
- Miñambres R, Guasch RM, Perez-Aragó A, Guerri C. The RhoA/ROCK-I/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci*. 2006; 119: 271-282.
- Miñana R, Sancho-Tello M, Climent E, Seguí JM, Renau-Piqueras J, Guerri C. Intracellular location, temporal expression, and polysialylation of neural cell adhesion molecule in astrocytes in primary culture. *Glia*. 1998; 24: 415-427.
- Minoshima Y, Kawashima T, Hirose K, Tonozuka Y, Kawajiri A, Bao YC, Deng X, Tatsuka M, Narumiya S, May WS Jr, Nosaka T, Semba K, Inoue T, Satoh T, Inagaki M, Kitamura T. Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*. 2003; 4: 549-560.

- Mirsky R, Jessen KR. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 1996; 6: 89-96.
- Mitchell KT, Ferrell JE Jr, Huestis WH. Separation of phosphoinositides and other phospholipids by two-dimensional thin-layer chromatography. *Anal Biochem.* 1986; 158: 447-453.
- Mitchell P, Mould R, Dillon J, Glautier S, Andrianakis I, James C, Pugh A, Holden-Dye L, O'Connor V. A differential role for neuropeptides in acute and chronic adaptive responses to alcohol: behavioural and genetic analysis in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2010; 5: e10422
- Moon SY, Zang H, Zheng Y. Characterization of a brain-specific Rho GTPase-activating protein, p200RhoGAP. *J Biol Chem.* 2003; 278: 4151-4159.
- Mori K, Amano M, Takefuji M, Kato K, Morita Y, Nishioka T, Matsuura Y, Murohara T, Kaibuchi K. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J Biol Chem.* 2009; 284: 5067-5076.
- Mori T, Buffo A, Götz M. The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2005; 69: 67-99.
- Mukherjee RA, Hollins S, Turk J. Fetal alcohol spectrum disorder: an overview. *J R Soc Med.* 2006; 99: 298-302.
- Murphy C, Saffrich R, Grummt W, Gournier H, Rybin V, Rubino M, Auvinen P, Lutcke A, Parton RG, Zerial M. Endosome dynamics regulated by a Rho protein. *Nature.* 1996; 384: 427-432.

-
- N**agy LE, Lakshman MR, Casey CA, Bearer CF. Ethanol and membrane protein trafficking: diverse mechanisms of ethanol action. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002; 26: 287-293.
- Nakajima H, Kunioka Y, Nakano K, Shimizu K, Seto M, Ando T. Scanning force microscopy of the interaction events between a single molecule of heavy meromyosin and actin. *Biochem Biophys Res Com.* 1997; 234: 178-182.
- Nakanishi H, Takai Y. Frabin and other related Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors couple the actin cytoskeleton with the plasma membrane. *J Cell Mol Med.* 2008; 12: 1169-1176.
- Newton PM, Messing RO. Intracellular signaling pathways that regulate behavioral responses to ethanol. *Pharmacol Ther.* 2006; 109: 227-237.
- Niessen CM, Yap AS. Another job for the talented p120-catenin. *Cell.* 2006; 127: 875-877.
- Niggli V. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; 21: 57-79.

Nishiyama T, Sasaki T, Takaishi K, Kato M, Yaku H, Araki K, Matsuura Y, Takai Y. Rac p21 is involved in insulin-induced membrane ruffling and rho p21 is involved in hepatocyte growth factor- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced membrane ruffling in KB cells. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 2447-2456.

Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 1995; 81: 53-62.

Noren NK, Arthur WT, Burrige K. Cadherin engagement inhibits RhoA via p190RhoGAP. *J Biol Chem.* 2003; 278: 13615-13618.

NSDUH. Substance Abuse and Mental Health Services Administration, Office of Applied Studies. (September 11, 2008). The NSDUH Report-Alcohol Use among Pregnant Women and Recent Mothers: 2002 to 2007. Rockville, MD.

Odorizzi G, Babst M, Emr SD. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci.* 2000; 25: 229-235.

Offenhäuser N, Castelletti D, Mapelli L, Soppo BE, Regondi MC, Rossi P, D'Angelo E, Frassoni C, Amadeo A, Tocchetti A, Pozzi B, Disanza A, Guarnieri D, Betsholtz C, Scita G, Heberlein U, Di Fiore PP. Increased ethanol resistance and consumption in Eps8 knockout mice correlates with altered actin dynamics. *Cell.* 2006; 127: 213-226.

Office of Applied Studies. Results from the 2006 National Survey on Drug Use and Health: National findings (DHHS Publication No. SMA 07-4293, NSDUH Series H-32). Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2007.

O'Hare ED, Kan E, Yoshii J, Mattson SN, Riley EP, Thompson PM, Toga AW, Sowell ER. Mapping cerebellar vermal morphology and cognitive correlates in prenatal alcohol exposure. *Neuroreport.* 2005; 16: 1285-1290.

Oude Weernink PA, Schulte P, Guo Y, Wetzel J, Amano M, Kaibuchi K, Haverland S, Voss M, Schmidt M, Mayr GW, Jakobs KH. Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 10168-10174.

Pan Y, Kaiguo M, Razak Z, Westwood JT, Gerlai R. Chronic alcohol exposure induced gene expression changes in the zebrafish brain. *Behav Brain Res.* 2010; [Epub ahead of print].

Panetti TS. Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1582: 190-196.

Panicker AK, Buhusi M, Thelen K, Maness PF. Cellular signalling mechanisms of neural cell adhesion molecules. *Front Biosci.* 2003; 8: d900-11.

Pantazis NJ, West JR, Dai D. The nitric oxide-cyclic GMP pathway plays an essential role in both promoting cell survival of cerebellar granule cells in culture and protecting the cells against ethanol neurotoxicity. *J Neurochem.* 1998; 70: 1826-1838.

- Pascual M, Guerri C. The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *J Neurochem.* 2007; 103: 557-568.
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, Zhang J, Revilla-Sanchez R, Sul JY, Takano H, Moss SJ, McCarthy K, Haydon PG. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science.* 2005; 310: 113-136.
- Pasti L, Pozzan T, Carmignoto G. Long-lasting changes of calcium oscillations in astrocytes. A new form of glutamate-mediated plasticity. *J Biol Chem.* 1995; 270: 15203-15210.
- Patrick J, Richardson B, Hasen G, Clarke D, Wlodek M, Bousquet J, Brien J. Effects of maternal ethanol infusion on fetal cardiovascular and brain activity in lambs. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 151: 859-867.
- Pellegrin S, Mellor H. Actin stress fibres. *J Cell Sci.* 2007; 120: 3491-3499
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia.* 2007; 55: 1251-1262.
- Peng Y, Yang PH, Ng SS, Wong OG, Liu J, He ML, Kung HF, Lin MC. A critical role of Pax6 in alcohol-induced fetal microcephaly. *Neurobiol Dis.* 2004; 16: 370-376.
- Peng Y, Kwok KH, Yang PH, Ng SS, Liu J, Wong OG, He ML, Kung HF, Lin MC. Ascorbic acid inhibits ROS production, NF-kappa B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology.* 2005; 48: 426-434.
- Philips MR, Pillinger MH, Staud R, Volker C, Rosenfeld MG, Weissmann G, Stock JB. Carboxyl methylation of Ras-related proteins during signal transduction in neutrophils. *Science.* 1993; 259: 977-980.
- Phillips DE. Effects of limited postnatal ethanol exposure on the development of myelin and nerve fibers in rat optic nerve. *Exp Neurol.* 1989; 103: 90-100.
- Platko JV, Leonard DA, Adra CN, Shaw RJ, Cerione RA, Lim B. A single residue can modify target-binding affinity and activity of the functional domain of the Rho-subfamily GDP dissociation inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 2974-2978.
- Polifka JE, Friedman JM. Medical genetics: 1. Clinical teratology in the age of genomics. *CMAJ.* 2002; 167: 265-273.
- Pollard TD. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 1986; 103: 2747-2754.
- Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell.* 2003; 112: 453-465.
- Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. *Alcohol Res Health.* 2000; 24: 93-104.

- Popović M, Caballero-Bleda M, Guerri C. Adult rat's offspring of alcoholic mothers are impaired on spatial learning and object recognition in the Can test. *Behav Brain Res.* 2006; 174: 101-111.
- Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 1863-1871.
- Pringle NP, Yu WP, Howell M, Colvin JS, Ornitz DM, Richardson WD. Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development.* 2003; 130: 93-102.
- Pucilowski O, Ayensu WK, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor I expression alters acute sensitivity and tolerance to ethanol in transgenic mice. *Eur J Pharmacol.* 1996; 305: 57-62.
- Puius YA, Mahoney NM, Almo SC. The modular structure of actin-regulatory proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1998; 10: 23-34.
-

Qualmann B, Kessels MM, Kelly RB. Molecular links between endocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 2000; 150: F111-F116.

Quesada A, Prada FA, Aguilera Y, Espinar A, Carmona A, Prada C. Peripapillary glial cells in the chick retina: A special glial cell type expressing astrocyte, radial glia, neuron, and oligodendrocyte markers throughout development. *Glia.* 2004; 46: 346-355.

Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature.* 1983; 303: 390-396.

Raftopoulou M, Hall A. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Develop Biol.* 2004; 265: 23-32.

Rahman H, Kentroti S, Vernadakis A. The critical period for ethanol effects on cholinergic neuronal expression in neuroblast-enriched cultures derived from 3-day-old chick embryo: NGF ameliorates the cholinotoxic effects of ethanol. *Int J Dev Neurosci.* 1994; 12: 397-404.

Ramakers GJ, Moolenaar WH. Regulation of astrocyte morphology by RhoA and lysophosphatidic acid. *Exp Cell Res.* 1998; 245: 252-262.

Ramanathan R, Wilkemeyer MF, Mittal B, Perides G, Charness ME. Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol.* 1996; 133: 381-390.

Randall CL, Saulnier JL. Effect of ethanol on prostacyclin, thromboxane, and prostaglandin E production in human umbilical veins. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995; 19: 741-746.

Raucher D, Stauffer T, Chen W, Shen K, Guo S, York JD, Sheetz MP, Meyer T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell.* 2000; 100: 221-228.

- Rayburn WF, Bogenschutz MP. Pharmacotherapy for pregnant women with addictions. *Am J Obstet Gynecol.* 2004; 191: 1885-1897.
- Rehm J, Room R, Monteiro M, Gmel G, Graham K, Rehn T, Sempos CT, Frick U, Jernigan D. Alcohol. (2004) In: WHO (ed), *Comparative quantification of health risks: Global and regional burden of disease due to selected major risk factors.* Geneva: WHO.
- Reichenbach A, Siegel A, Rickmann M, Wolff JR, Noone D, Robinson SR. Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function. *J Hirnforsch.* 1995; 36: 509-517.
- Renau-Piqueras J, Zaragoza R, De Paz P, Baguena-Cervellera R, Megias L, Guerri C. Effects of prolonged ethanol exposure on the glial fibrillary acidic protein-containing intermediate filaments of astrocytes in primary culture: a quantitative immunofluorescence and immunogold electron microscopic study. *J Histochem Cytochem.* 1989; 37: 229-240.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth-Factor Induced Membrane Ruffling. *Cell.* 1992; 70: 401-410.
- Ridley AJ. Stress fibres take shape. *Nature Cell Biol.* 1999; 1: E64-E66.
- Ridley AJ. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 2001; 114: 2713-2722.
- Riikonen R, Salonen I, Partanen K, Verho S. Brain perfusion SPECT and MRI in foetal alcohol syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 1999; 41: 652-659.
- Riikonen RS, Nokelainen P, Valkonen K, Kolehmainen AI, Kumpulainen KI, Könönen M, Vanninen RL, Kuikka JT. Deep serotonergic and dopaminergic structures in fetal alcoholic syndrome: a study with nor-beta-CIT-single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging volumetry. *Biol Psychiatry.* 2005; 57: 1565-1572.
- Riley EP, McGee CL. Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior. *Exp Biol Med.* 2005; 230: 357-65.
- Roebuck TM, Simmons RW, Mattson SN, Riley EP. Prenatal exposure to alcohol affects the ability to maintain postural balance. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22: 252-258.
- Roebuck-Spencer TM, Mattson SN. Implicit strategy affects learning in children with heavy prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004; 28: 1424-1431.
- Rohn JL, Baum B. Actin and cellular architecture at a glance. *J Cell Sci.* 2010; 123: 155-158.
- Rosso L, Mienville JM. Pituicyte modulation of neurohormone output. *Glia.* 2009; 57: 235-243.
- Rothenfluh A, Heberlein U. Drugs, flies, and videotape: the effects of ethanol and cocaine on *Drosophila* locomotion. *Curr Opin Neurobiol.* 2002; 12: 639-645.
- Rothenfluh A, Threlkeld RJ, Bainton RJ, Tsai LT, Lasek AW, Heberlein U. Distinct behavioral responses to ethanol are regulated by alternate RhoGAP18B isoforms. *Cell.* 2006; 127: 199-211.

- Rozelle AL, Machesky LM, Yamamoto M, Driessens MH, Insall RH, Roth MG, Luby-Phelps K, Marriott G, Hall A, Yin HL. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol.* 2000; 10: 311-320.
- Rubert G, Miñana R, Pascual M, Guerri C. Ethanol exposure during embryogenesis decreases the radial glial progenitor pool and affects the generation of neurons and astrocytes. *J Neurosci Res.* 2006; 84: 483-496.
- Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 11-28.
- Rubio Valladolid G, Santo-Domingo Carrasco J. Guía práctica de intervención en el alcoholismo. Madrid: Agencia Antidroga, Consejería de Sanidad. 2000.

-
- S**aarikangas J, Zhao H, Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev.* 2010; 90: 259-289.
- Safer D, Sosnick TR, Elzinga M. Thymosin beta 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends. *Biochemistry.* 1997; 36: 5806-5816.
- Sahai E, Alberts AS, Treisman R. RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *EMBO J.* 1998; 17: 1350-1361.
- Sakisaka T, Itoh T, Miura K, Takenawa T. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol.* 1997; 17: 3841-3849.
- Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene P, Hanson JW, Graham JM Jr. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology.* 1997; 56: 317-326.
- Sánchez A, Hidalgo MJ. Efectos fetales del alcohol. El síndrome alcohólico fetal. En *Tratado de Alcoholología*. Madrid. 2000: 285-303
- Sarthy V, Ripps H. *The Retinal Müller Cell: Structure and Function*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001.
- Sasaki J, Kofuji S, Itoh R, Momiyama T, Takayama K, Murakami H, Chida S, Tsuya Y, Takasuga S, Eguchi S, Asanuma K, Horie Y, Miura K, Davies EM, Mitchell C, Yamazaki M, Hirai H, Takenawa T, Suzuki A, Sasaki T. The PtdIns(3,4)P(2) phosphatase INPP4A is a suppressor of excitotoxic neuronal death. *Nature.* 2010; 465: 497-501.
- Sasaki T, Takasuga S, Sasaki J, Kofuji S, Eguchi S, Yamazaki M, Suzuki A. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. *Prog Lipid Res.* 2009; 48: 307-343.
- Saunders DE, Zajac CS, Wappler NL. Alcohol inhibits neurite extension and increases N-myc and c-myc proteins. *Alcohol.* 1995; 12: 475-483.
- Saunders DE, DiCerbo JA, Williams JR, Hannigan JH. Alcohol reduces neurofilament protein levels in primary cultured hippocampal neurons. *Alcohol.* 1997; 14: 519-526.

- Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol.* 1996; 135: 169-179.
- Schaffert CS, Todero SL, Casey CA, Thiele GM, Sorrell MF, Tuma DJ. Chronic ethanol treatment impairs Rac and Cdc42 activation in rat hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006; 30: 1208-1213.
- Scherle P, Behrens T, Staudt LM. Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 7568-7572.
- Schliwa M, Woehlke G. Molecular motors. *Nature.* 2003; 422: 759-765.
- Schoenenberger CA, Steinmetz MO, Stoffler D, Mandinova A, Aebi U. Structure, assembly, and dynamics of actin filaments in situ and in vitro. *Microsc Res Tech.* 1999; 47: 38-50.
- Schwartz JP. Neurotransmitters as neurotrophic factors: a new set of functions. *Int Rev Neurobiol.* 1992; 34: 1-23.
- Sechi AS, Wehland J. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 2000; 113: 3685-95.
- Self AJ, Hall A. Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol.* 1995; 256: 67-76.
- Selinfreund RH, Barger SW, Pledger WJ, Van Eldik LJ. Neurotrophic protein S100 beta stimulates glial cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88: 3554-3558.
- Sepp KJ, Auld VJ. RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia. *Development.* 2003; 130: 1825-1835.
- Settleman J. A memory GAP. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 285-287.
- Sheterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. *Protein Profile.* 1995; 2: 1-103.
- Shibasaki Y, Ishihara H, Kizuki N, Asano T, Oka Y, Yazaki Y. Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem.* 1997; 272: 7578-7581.
- Shibley IA Jr, Pennington SN. Metabolic and mitotic changes associated with the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Alcohol.* 1997; 32: 423-434.
- Shiota M, Tanihiro T, Nakagawa Y, Aoki N, Ishida N, Miyazaki K, Ullrich A, Miyazaki H. Protein tyrosine phosphatase PTP20 induces actin cytoskeleton reorganization by dephosphorylating p190 RhoGAP in rat ovarian granulosa cells stimulated with follicle-stimulating hormone. *Mol Endocrinol.* 2003; 17: 534-549.
- Shu T, Richards LJ. Cortical axon guidance by the glial wedge during the development of the corpus callosum. *J Neurosci.* 2001; 21: 2749-2758.

- Siler-Marsiglio KI, Shaw G, Heaton MB. Pycnogenol and vitamin E inhibit ethanol-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *J Neurobiol.* 2004; 59: 261-271.
- Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience.* 2004; 129: 877-896.
- Singh LD, Singh SP, Handa RK, Ehmann S, Snyder AK. Effects of ethanol on GLUT1 protein and gene expression in rat astrocytes. *Metab Brain Dis.* 1996; 11: 343-357.
- Skoff RP, Knapp PE. Division of astroblasts and oligodendroblasts in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages. *Glia.* 1991; 4: 165-174.
- Slater SJ, Cook AC, Seiz JL, Malinowski SA, Stagliano BA, Stubbs CD. Effects of ethanol on protein kinase C alpha activity induced by association with Rho GTPases. *Biochemistry.* 2003; 42: 12105-12114.
- Slezak M, Pfrieder FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 531-535.
- Small JV, Isenberg G, Celis JE. Polarity of Actin at Leading-Edge of Cultured-Cells. *Nature.* 1978; 272: 638-639.
- Small JV, Stradal T, Vignal E, Rottner K. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 2002; 12: 112-120.
- Smith SM. Alcohol-induced cell death in the embryo. *Alcohol Health Res World.* 1997; 21: 287-297.
- Snyder AK, Jiang F, Singh SP. Effects of ethanol on glucose utilization by cultured mammalian embryos. *Alcohol Clin Exp Res.* 1992; 16: 466-470.
- Sordella R, Jiang W, Chen GC, Curto M, Settleman J. Modulation of Rho GTPase signaling regulates a switch between adipogenesis and myogenesis. *Cell.* 2003; 113: 147-158.
- Soriano E, Alvarado-Mallart RM, Dumesnil N, Del Río JA, Sotelo C. Cajal-Retzius cells regulate the radial glia phenotype in the adult and developing cerebellum and alter granule cell migration. *Neuron.* 1997; 18: 563-577.
- Sowell ER, Jernigan TL, Mattson SN, Riley EP, Sobel DF, Jones KL. Abnormal development of the cerebellar vermis in children prenatally exposed to alcohol: size reduction in lobules I-V. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996; 20: 31-34.
- Sowell ER, Mattson SN, Thompson PM, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW. Mapping callosal morphology and cognitive correlates: effects of heavy prenatal alcohol exposure. *Neurology.* 2001; 57: 235-244.
- Sowell ER, Thompson PM, Mattson SN, Tessner KD, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW. Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb Cortex.* 2002; 12: 856-865.
- Spohr HL, Willms J, Steinhausen HC. Fetal alcohol spectrum disorders in young adulthood. *J Pediatr.* 2007; 150: 175-179.

- Spong CY, Abebe DT, Gozes I, Brenneman DE, Hill JM. Prevention of fetal demise and growth restriction in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001; 297: 774-779.
- Stanton ME, Goodlett CR. Neonatal ethanol exposure impairs eyeblink conditioning in weanling rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22: 270-275.
- Steiner MR, Urso JR, Klein J, Steiner SM. Multiple astrocyte responses to lysophosphatidic acids. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1582: 154-160.
- Streissguth AP, Barr HM, Martin DC. Offspring effects and pregnancy complications related to self-reported maternal alcohol use. *Dev Pharmacol Ther.* 1982; 5: 21-32.
- Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *JAMA.* 1991; 265: 1961-1967.
- Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science.* 1981; 214: 936-938.
- Sulik KK. Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med (Maywood).* 2005; 230: 366-375.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem.* 1999; 274: 33179-33182.
- Svitkina TM, Borisy GG. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 1999; 145: 1009-1026.
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 2003; 160: 409-421.

Takahama S, Hirose T, Ohno S. aPKC restricts the basolateral determinant PtdIns(3,4,5)P3 to the basal region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 368: 249-255.

Takai Y, Sasaki T, Tanaka K, Nakanishi H. Rho as a regulator of the cytoskeleton. *Trends Biochem Sci.* 1995; 20: 227-231.

Takenawa T, Itoh T. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1533: 190-206.

Taniguchi S, Liu H, Nakazawa T, Yokoyama K, Tezuka T, Yamamoto T. p250GAP, a neural RhoGAP protein, is associated with and phosphorylated by Fyn. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 306: 151-155.

- Taylor JM, Hildebrand JD, Mack CP, Cox ME, Parsons JT. Characterization of graf, the GTPase-activating protein for rho associated with focal adhesion kinase. Phosphorylation and possible regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1998; 273: 8063-8070.
- Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol. Cell.* 2007; 99: 67-86.
- Thomas JD, Garcia GG, Dominguez HD, Riley EP. Administration of eliprodil during ethanol withdrawal in the neonatal rat attenuates ethanol-induced learning deficits. *Psychopharmacology.* 2004; 175: 189-195.
- Tolias KF, Hartwig JH, Ishihara H, Shibasaki Y, Cantley LC, Carpenter CL. Type I alpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol.* 2000; 10: 153-156.
- Tomar A, Lim ST, Lim Y, Schlaepfer DD. A FAK-p120RasGAP-p190RhoGAP complex regulates polarity in migrating cells. *J. Cell Sci.* 2009; 122: 1852-1862.
- Tomás M, Fornas E, Megías L, Durán JM, Portolés M, Guerri C, Egea G, Renau-Piqueras J. Ethanol impairs monosaccharide uptake and glycosylation in cultured rat astrocytes. *J Neurochem.* 2002; 83: 601-612.
- Tomás M, Lázaro-Diéguez F, Durán JM, Marín P, Renau-Piqueras J, Egea G. Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes. *J Neurochem.* 2003; 87: 220-229.
- Tominaga T, Barber DL. Na-H exchange acts downstream of RhoA to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 2287-2303.
- Tominaga T, Ishizaki T, Narumiya S, Barber DL. p160ROCK mediates RhoA activation of Na-H exchange. *EMBO J.* 1998; 17: 4712-4722.
- Tou JS, Gill JS. Lysophosphatidic acid increases phosphatidic acid formation, phospholipase D activity and degranulation by human neutrophils. *Cell Signal.* 2005; 17: 77-82.
- Tran D, Gascard P, Berthon B, Fukami K, Takenawa T, Giraud F, Claret M. Cellular distribution of polyphosphoinositides in rat hepatocytes. *Cell Signal.* 1993; 5: 565-581.
- Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. *J Biol Chem.* 1999; 274: 34507-34510.
- Turner M, Golovko VB, Vaughan OP, Abdulkin P, Berenguer-Murcia A, Tikhov MS, Johnson BF, Lambert RM. Selective oxidation with dioxygen by gold nanoparticle catalysts derived from 55-atom clusters. *Nature.* 2008 ; 454: 981-983.

U.S. Department of Health and Human Services. (2005, February 21 [posted]; 2007, January 4 [last revised]). U.S. Surgeon General releases advisory on alcohol use in pregnancy: Urges women who are pregnant or who may become pregnant to abstain from alcohol. Retrieved July 22, 2008, from <http://www.surgeongeneral.gov/pressreleases/sg02222005.html>

Urso T, Gavaler JS, Van Thiel DH. Blood ethanol levels in sober alcohol users seen in an emergency room. *Life Sci.* 1981; 28: 1053-1056.

Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 2003; 112: 467-480.

Vallés S, Pitarch J, Renau-Piqueras J, Guerri C. Ethanol exposure affects glial fibrillary acidic protein gene expression and transcription during rat brain development. *J Neurochem.* 1997; 69: 2484-2493.

Van Aelst L, Joneson T, Barsagi D. Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J.* 1996; 15: 3778-3786.

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 1997; 11: 2295-2322.

Van Haastert PJ, Veltman DM. Chemotaxis: navigating by multiple signaling pathways. *Sci STKE.* 2007; 2007: pe40.

Vance JE, Hayashi H, Karten B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2005; 16: 193-212.

Vanderkerckhove J, Weber K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J Mol Biol.* 1984; 179: 391-413.

Verkhatsky A, Butt AM, editors. *Glial Neurobiology*. Chishester, UK: Wiley; 2007.

Vesce S, Bezzi P, Volterra A. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci.* 1999; 56: 991-1000.

Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* 2008; 27: 2457-2470.

Vincent S, Settleman J. Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol.* 1999; 78: 539-548.

Voelker DR. New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res.* 2003; 44: 441-449.

Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6: 626-640.

- W**alz W. Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia*. 2002; 40: 1-10.
- Wang PS, Wang J, Xiao ZC, Pallen CJ. Protein-tyrosine phosphatase alpha acts as an upstream regulator of Fyn signaling to promote oligodendrocyte differentiation and myelination. *J Biol Chem*. 2009; 284: 33692-33702.
- Watanabe N, Kato T, Fujita A, Ishizaki T, Narumiya S. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. 1999; 1: 136-143.
- Wegner A. Treadmilling of actin at physiological salt concentrations. An analysis of the critical concentrations of actin filaments. *J Mol Biol*. 1982; 161: 607-615.
- Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res*. 2004; 301: 43-49.
- Wildenberg GA, Dohn MR, Carnahan RH, Davis MA, Lobdell NA, Settleman J, Reynolds AB. p120-catenin and p190RhoGAP regulate cell-cell adhesion by coordinating antagonism between Rac and Rho. *Cell*. 2006; 127: 1027-1039.
- Wilkemeyer MF, Sebastian AB, Smith SA, Charness ME. Antagonists of alcohol inhibition of cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 3690-3695.
- Wilkemeyer MF, Menkari CE, Charness ME. Novel antagonists of alcohol inhibition of I1-mediated cell adhesion: multiple mechanisms of action. *Mol Pharmacol*. 2002; 62: 1053-1060.
- Wilkemeyer MF, Chen SY, Menkari CE, Brenneman DE, Sulik KK, Charness ME. Differential effects of ethanol antagonism and neuroprotection in peptide fragment NAPVSIPQ prevention of ethanol-induced developmental toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 8543-8548.
- Windham GC, Von Behren J, Fenster L, Schaefer C, Swan SH. Moderate maternal alcohol consumption and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology*. 1997; 8: 509-514.
- Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*. 2002; 39: 187-199.
- Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119: 75-88.
- Wolf RM, Wilkes JJ, Chao MV, Resh MD. Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *J Neurobiol*. 2001; 49: 62-78.
- Wozniak DF, Hartman RE, Boyle MP, Vogt SK, Brooks AR, Tenkova T, Young C, Olney JW, Muglia LJ. Apoptotic neurodegeneration induced by ethanol in neonatal mice is associated with profound learning/memory deficits in juveniles followed by progressive functional recovery in adults. *Neurobiol Dis*. 2004; 17: 403-414.

Wu WJ, Leonard DA, A-Cerione R, Manor D. Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem.* 1997; 272: 26153-26158.

Wu WJ, Erickson JW, Lin R, Cerione RA. The gamma-subunit of the coatamer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature.* 2000; 405: 800-804.

Wymann MP, Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 162-176.

Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F. Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 1998; 9: 993-1006.

Yao X, Chaponnier C, Gabbiani G, Forte JG. Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells. *Mol Biol Cell.* 1995; 6: 541-557.

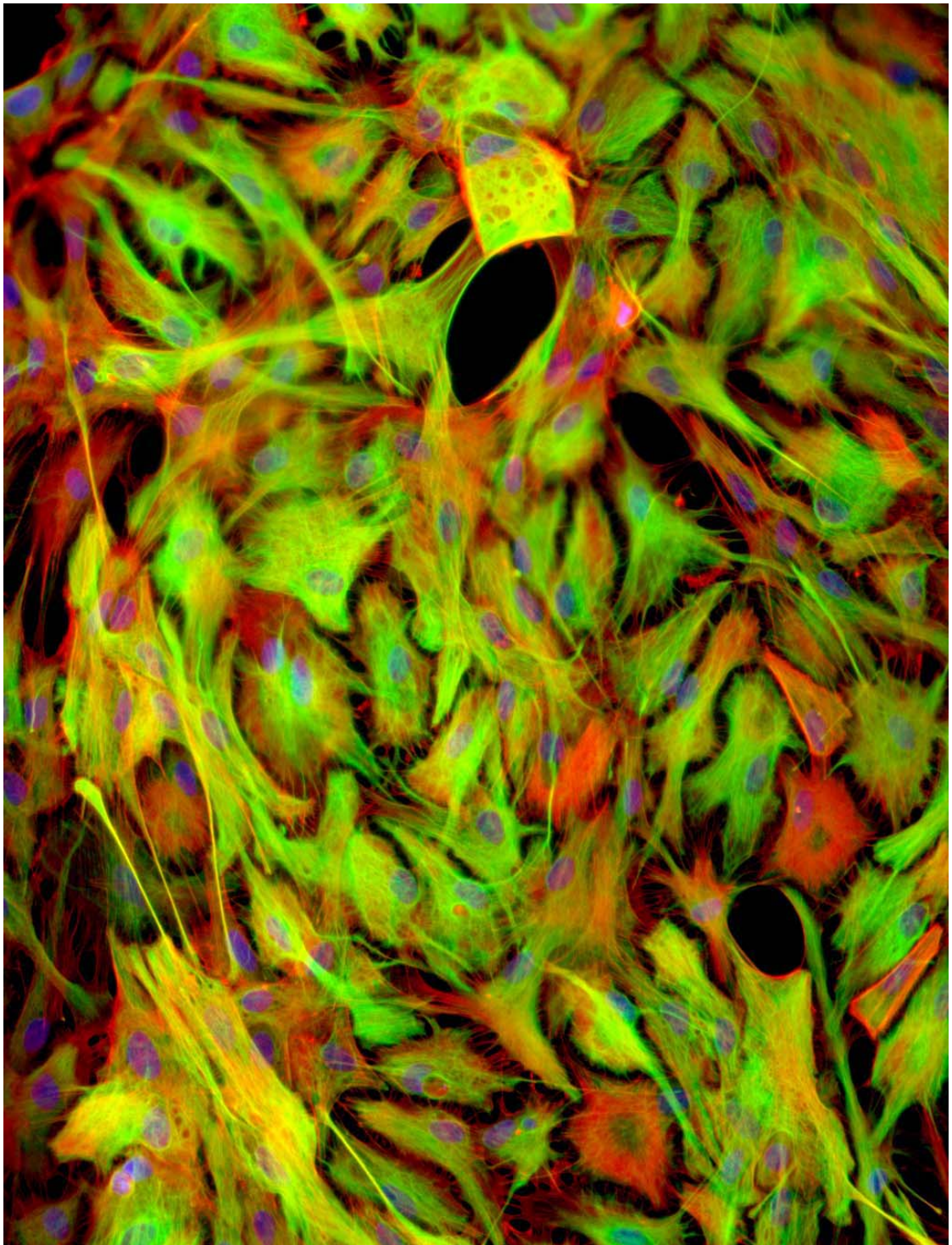
Yin HL, Janmey PA. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol.* 2003; 65: 761-789.

Young C, Roth KA, Klocke BJ, West T, Holtzman DM, Labruyere J, Qin YQ, Dikranian K, Olney JW. Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 2005; 20: 608-614.

Zhang L, Goldman JE. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol.* 1996; 370: 536-550.

Zhou FC, Sari Y, Powrozek TA. Fetal alcohol exposure reduces serotonin innervation and compromises development of the forebrain along the serotonergic pathway. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29: 141-149.

Zohn IM, Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Der CJ. Rho family proteins and Ras transformation: the RHOad less traveled gets congested. *Oncogene.* 1998; 17: 1415-1438.



VII. - ANEXOS

1. Producción de un modelo de BBB *in vitro*

1.1. Objetivo

Uno de nuestros objetivos dentro del proyecto CONSOLIDER-Nanobiomed era establecer un modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (BBB). La finalidad era proporcionar una plataforma biológica sobre la cual evaluar la capacidad para atravesar la BBB por parte de péptidos, como un método de análisis preliminar a ensayos en modelos animales. Posteriormente, el grupo del Dr. Ernest Giralt (IRB-PCB, Barcelona) evaluaría dicha capacidad por parte de una variedad de péptidos avalados por ensayos previos a los que se les acoplaran fármacos actuando en su conjunto como dianas cerebrales.

1.2. Introducción

La BBB está situada en la interfase del torrente sanguíneo y el tejido nervioso y su principal función es la de mantener la homeostasis del SNC. Sin embargo, la BBB no es homogénea en un recorrido por el mismo, permaneciendo defenestrados los capilares de los órganos circumventriculares (Begley, 2004). Los capilares sanguíneos la BBB tienen una longitud aproximada de 600 km y ocupan una superficie de 20 m².

La BBB está formada por las células endoteliales de los capilares sanguíneos cerebrales (BCEC) (Rubin y Staddon, 1999), aunque otros tipos celulares como los pericitos, los astrocitos y las neuronas también juegan un papel importante en la función de la BBB (Gaillard y col., 2000; Lai y Kuo, 2005) (Figura 1). Las BCEC se diferencian de las células endoteliales periféricas en que presentan uniones estrechas entre ellas, lo que limita el transporte paracelular de la sangre al cerebro de moléculas hidrófilas (Rubin y Staddon, 1999). Este transporte se ve limitado como resultado de un transporte transcitótico bajo, una elevada actividad metabólica (Ciechanover, 2005) y la falta de fenestraciones (Pardridge, 2005). Por lo tanto, la BBB funciona como una barrera física, metabólica e inmunológica (Ciechanover, 2005; el-Bacha y Minn 1999; Wekerle, 2002).

Todas estas características de la BBB están inducidas y mantenidas por las prolongaciones astrocitarias que envuelven las BCEC (Figura 1) (Rubin y Staddon, 1999; Gaillard y col., 2000), y las proyecciones neuronales que inervan las BCEC (Hendry y col., 1983). Los pericitos participan estructuralmente en la formación de la BBB, ya que comparten la lámina basal con

las BCEC y su actividad fagocítica confiere otra capacidad más a la BBB (Lai y Kuo, 2005). Además, los pericitos regulan la homeostasis endotelial, induciendo la secreción del inhibidor de la activación del plasminógeno (PAI-1) y disminuyendo la fibrinólisis endotelial del cerebro (Kim y col., 2005).

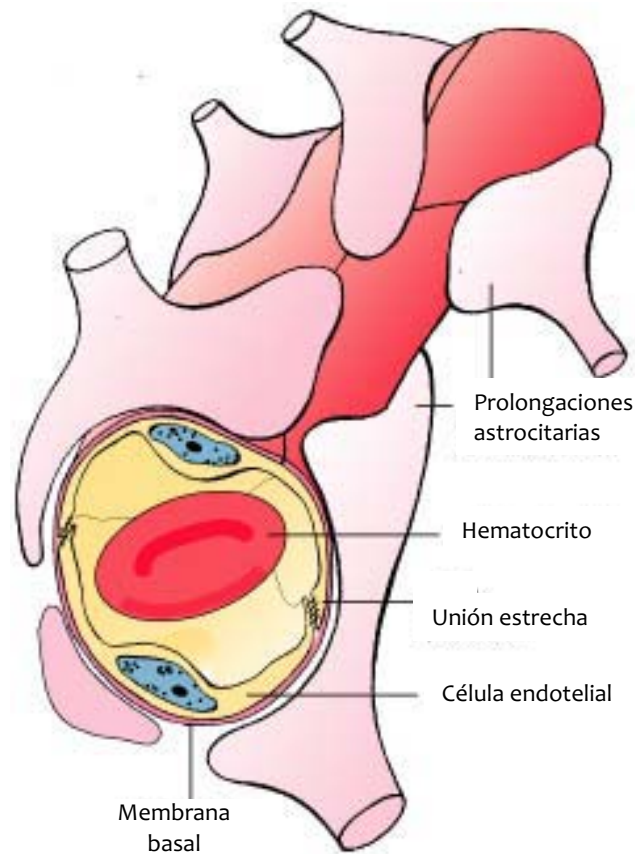


Figura 1. La unidad neurovascular. La barrera hematoencefálica está formada por en las células endoteliales unidas entre sí por uniones estrechas, la membrana basal del endotelio, los pericitos y los pies perivasculariales de los astrocitos. Imagen modificada de Ross y col., 2004)

Se ha descrito la implicación de diversos sistemas de transporte capaces de actuar en la BBB (Figura 2). Estos sistemas están mediados por receptores o por transportadores, incluyendo sistemas aniónicos como: la glicoproteína-P (Cordon-Cardo y col., 1989; Schinkel y col., 1995), proteínas resistentes a fármacos (Borst y col., 1999; de Boer y col., 2003), transportadores de nucleósidos, transportadores de aniones y cationes orgánicos, transportadores de aminoácidos grandes, receptores de transferrina y melano transferrina, y receptores lanzadera SB-A1 y SB-B1 (Lee y col., 2001; Loscher y Potschka, 2005). Muchos de estos sistemas son relevantes en las implicaciones clínicas como consecuencia de la administración de fármacos (Ho y Kim, 2005). Diversos procesos patológicos pueden alterar la capacidad de la BBB para regular la homeostasis cerebral, lo que conlleva un cambio de funcionalidad de la BBB.

Existen varias posibilidades para transportar fármacos a través de la BBB tal como se indica en la figura 2. En la BBB el paso de compuestos hidrofílicos por transporte paracelular está muy limitado. Otro transporte, el de la difusión pasiva depende de la lipofilidad, el peso molecular (< 400 kDa) y la capacidad de formar puentes de hidrógeno por parte del compuesto (Figura 2).

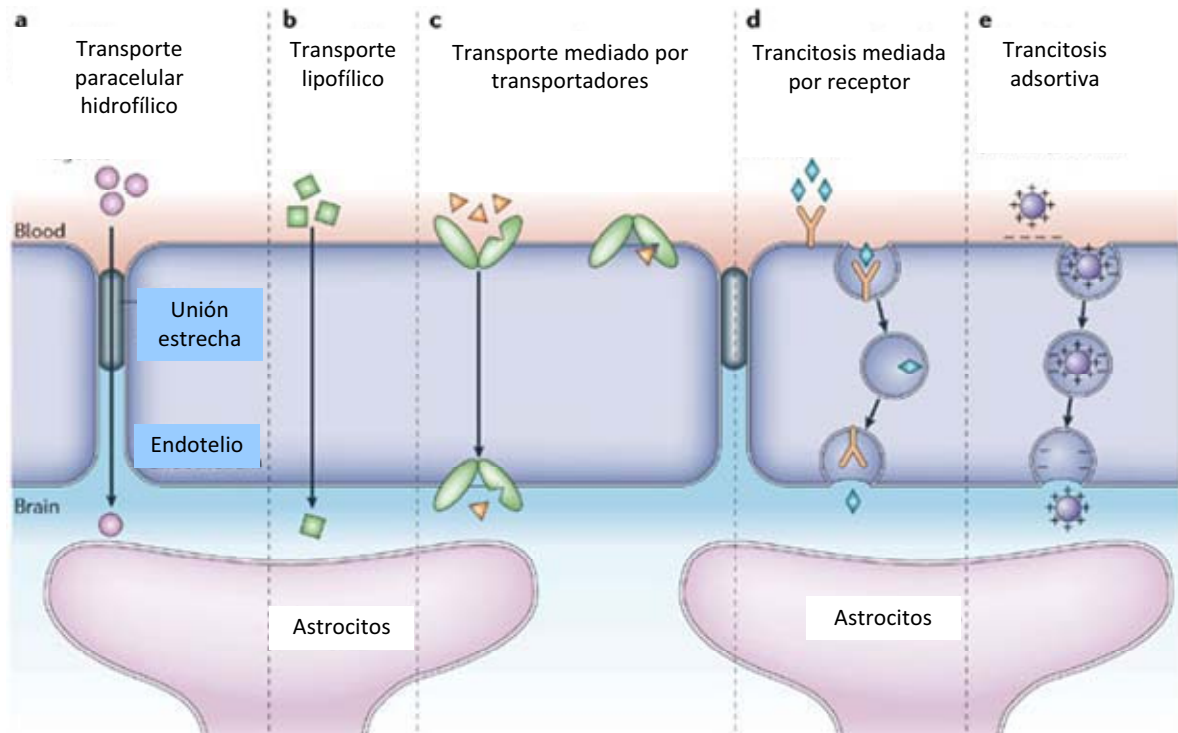


Figura 2. Diferentes vías de transporte que cruzan la barrera hematoencefálica. Imagen modificada de Abbott y col., 2006.

Los sistemas de transporte activo pueden dividirse en adsorptivos, por transportador o por receptor. La trancitosis mediada por adsorción consiste en la unión de sustancias policatiónicas a las cargas negativas de la membrana plasmática y su posterior endocitosis. No obstante, una adsorción impuesta mediante sustancias policatiónicas no específicas puede desembocar en una ruptura de la integridad de la BBB (Lockman y col., 2004). La vía de la trancitosis mediante receptor es dependiente de sustrato y se utiliza para la incorporación de nutrientes al cerebro (Abbott y Romero, 1996). Además, la tasa de transporte depende del grado de ocupación del transportador. Por último, el paso de sustancias a través de un transportador, permite la entrada en el SNC de moléculas de gran tamaño. Además de los múltiples mecanismos de entrada existen diversos mecanismos de salida o expulsión de compuestos. Uno de los más conocidos es la glicoproteína-P, proteína transmembranal localizada en la membrana apical de las células endoteliales (Schinkel y col., 1995).

Por lo tanto, se ha demostrado que la BBB es una estructura dinámica que combina una difusión restringida al cerebro y mecanismos de transporte especializados.

Siempre ha existido un gran interés por establecer modelos celulares que recrearan las propiedades de la BBB, básicamente por dos motivos. El primero para establecer un sistema de ensayo sobre el cual predecir el paso de fármacos a través de la BBB. El segundo el intentar comprender cómo las características fenotípicas de las BCEC pueden llegar a modificarse. En estos modelos se pueden evaluar diversas propiedades de las BCEC como por ejemplo la resistencia de las uniones estrechas, el grado de endocitosis, o la presencia de transportadores específicos.

Estos modelos *in vitro* de la BBB se han desarrollado cultivando células sobre membranas porosas, más conocidas como Transwells®. Los primeros ensayos utilizaban cultivos primarios de BCEC o líneas celulares estables derivadas de BCEC de origen bovino, porcino o murino. (Audus y col., 1996). En estos modelos, las BCEC crecían en condiciones arquetípicas de cultivo y eran capaces de formar uniones estrechas, pero mostraban resistencia eléctrica transendotelial (TEER) ($\approx 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (Audus y col., 1996). La TEER es un parámetro contrastado de referencia, indicador del grado de compactación de la monocapa de BCEC. Asimismo, nos indica su impermeabilidad y por tanto su similitud con las BCEC de la BBB. Sin embargo, en estos modelos que solamente utilizan una capa de células endoteliales (Haorah y col., 2008) el ambiente del cultivo dista mucho del presente en la BBB en condiciones fisiológicas. Por ello, una estrategia más reciente es la de utilizar astrocitos, debido a que liberan factores solubles que desencadenan señalizaciones intracelulares que confieren impermeabilidad a las BCEC (Abbott y col., 2006) (explicado ampliamente en el punto 2.3 de la introducción). Los astrocitos pueden situarse en el fondo del pozo de cultivo (Cechelli y col., 2007). Los mejores resultados se han obtenido en aquellos co-cultivos donde los astrocitos se cultivan en la cara opuesta del Transwells® (Gaillard y col., 2001; Demeuse y col., 2002), ya que las prolongaciones astrocitarias pueden extenderse a través de los poros y establecer contactos directos con las BCEC. Además se obtiene una mayor compactación de las BCEC si se utiliza como medio de cultivo, el medio proveniente de cultivos primarios de astrocitos (Gaillard y col., 2001); y compuestos que incrementen los niveles de cAMP, molécula involucrada en la producción de uniones estrechas en las BCEC (Rist y col., 1997). Otros estudios, utilizan co-cultivos con BCEC de origen porcino (Nitz y col., 2003). Por último, además de la formación de co-cultivos existen otros modelos son viables y exitosos, como por ejemplo aquellos en que las BCEC y astrocitos crecen en tubos permeables expuestos a un flujo continuo que simula el torrente sanguíneo (Cucullo y col., 2008).

En nuestro laboratorio establecimos un modelo de BBB *in vitro* siguiendo las directrices que nos dio el Dr. Albertus G. deBoer, de la Universidad de Utrecht (Gaillard y de Boer, 2008).

1.3. Resultados

1.3.1. Fenotipo de los cultivos primarios y co-cultivos

Previamente a la formación de los co-cultivos observamos la integridad y viabilidad de los cultivos de células endoteliales y astrocitos corticales por separado. Inmunofluorescencias de astrocitos corticales en cultivo mostraban un marcaje evidente de la proteína glial ácida fibrilar (GFAP), lo que nos confirmaba la naturaleza astroglial del cultivo. Tanto el citoesqueleto de actina como la morfología celular eran las habituales de cultivos primarios de astrocitos (Figura 3).

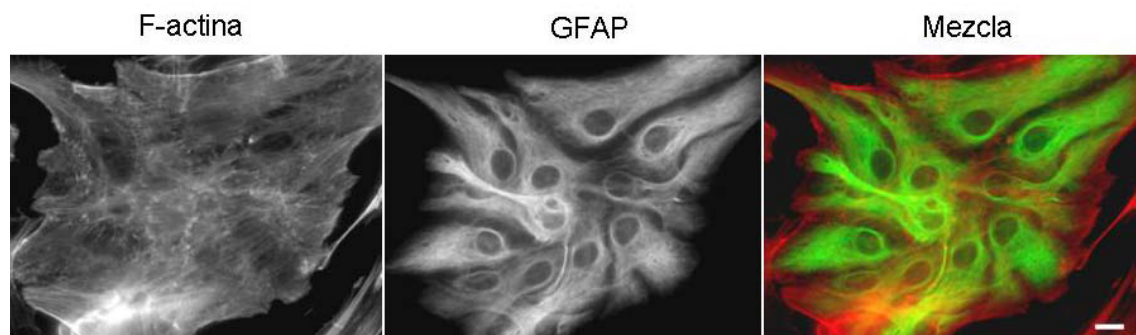


Figura 3. Cultivos primarios de astrocitos. Las imágenes de las inmunofluorescencias nos muestran el citoesqueleto de actina y los filamentos intermedios (GFAP) de astrocitos corticales de ratas neonatales.

Por su parte, las BCEC en cultivo presentaban dos fenotipos distintos. A una densidad celular baja las células no mostraban uniones estrechas entre ellas ni la proteína zona occludens 1 (ZO-1), la cual está implicada en las uniones estrechas, presentaba una distribución citoplasmática. El citoesqueleto de actina mostraba una organización habitual donde aparecían fibras de estrés, lamelipodios y filopodios (Figura 4). En cambio, a una densidad celular alta, las BCEC formaban una monocapa y se producía un reclutamiento de ZO-1 en las uniones intercelulares. Además, el citoesqueleto de actina sufría una reorganización, donde se apreciaba un aumento de fibras de estrés, y un refuerzo de la actina cortical (Figura 5).

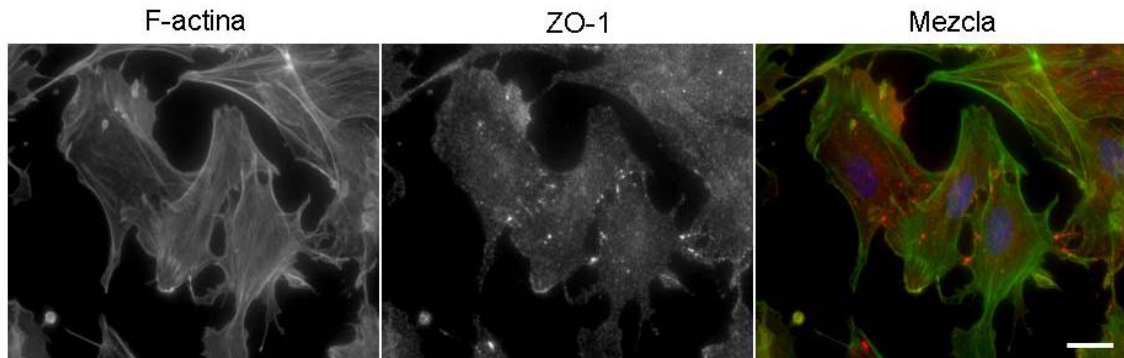


Figura 4. BCEC cultivadas a densidad celular baja. El citoesqueleto de actina se encuentra bien organizado y ZO-1 presenta una distribución citoplasmática.

Las inmunofluorescencias de los co-cultivos de BCEC y astrocitos corticales en los Transwells® indicaban que el modelo *in vitro* de BBB se estaba llevando a cabo correctamente (Figura 6A). El marcaje nuclear con DAPI nos indicaba que ambos tipos celulares se habían adherido correctamente a la membrana y que la viabilidad celular era la correcta (Figura 6B).

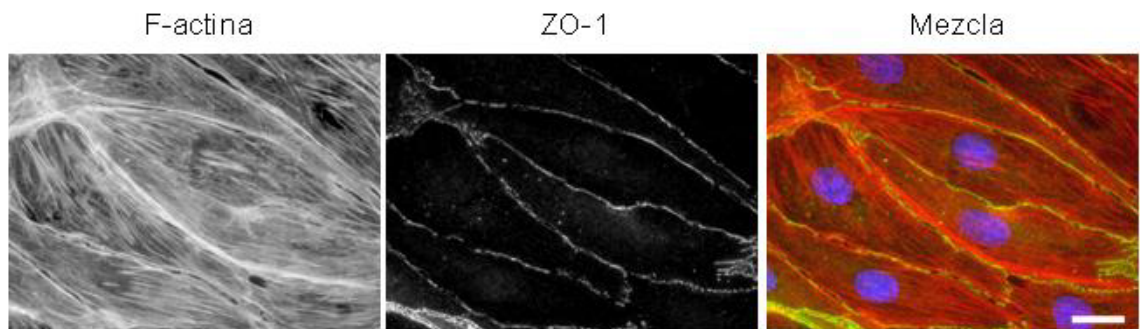


Figura 5. BCEC cultivadas a densidad celular alta. El citoesqueleto de actina muestra un aumento de las fibras de estrés y un refuerzo en la zona cortical y ZO-1 se localiza en las uniones intercelulares.

La ZO-1 mostraba que se había formado una monocapa de BCEC en la parte superior del filtro y que formaban uniones estrechas entre ellas (Figura 6B). Por otro lado, se podía observar que el tipo celular que se encontraban adherido al otro lado del Transwells® eran astrocitos, como indicaba el marcaje de GFAP (Figura 6B).

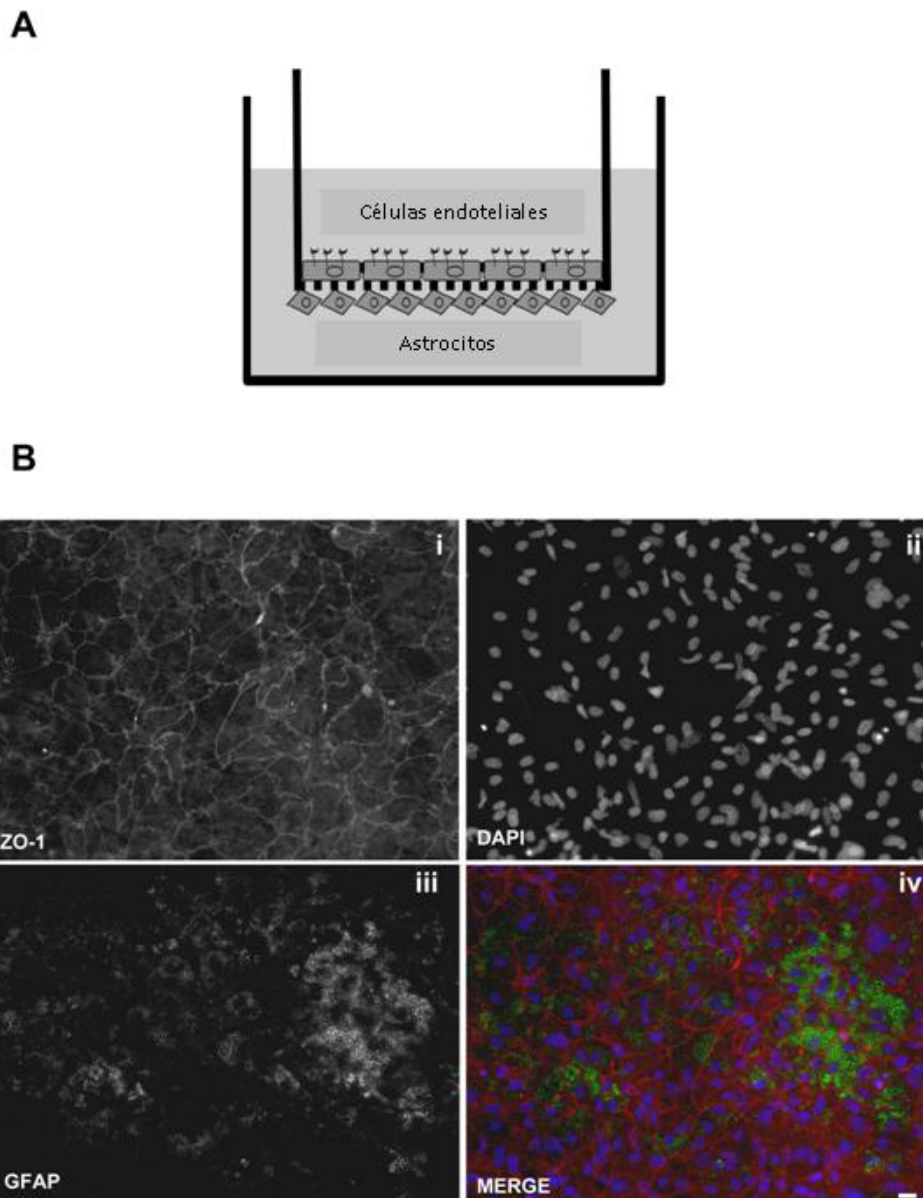


Figura 6. Co-cultivos de BVEC y astrocitos corticales sobre Transwells®. Las células endoteliales forman uniones estrechas entre ellas, a lo cual contribuyen los astrocitos.

1.3.2. Grado de compactación/impermeabilidad de los co-cultivos

Para determinar la compactación de las células cultivadas en los Transwells®, y por tanto su impermeabilidad, calculamos la TEER (Figura 7Ai y ii). En filtros sobre los que se sembraron solamente astrocitos, los valores de TEER eran casi nulos (Figura 7Bi). Aquellos filtros sobre los cuales se cultivaron monocapas de BVEC mostraban valores de $25 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a los seis días de co-cultivo, y llegaban a alcanzar valores máximos de $80 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a los 9 días (Figura 7Bi). Estos últimos valores se obtuvieron aumentando los niveles de AMP cíclico (cAMP), mediante cAMP exógeno y un inhibidor de la fosfodiesterasa 4, RO-20 (RO-20-1724) (Figura 7Aii). De todas

formas, los valores logrados en las monocapas de BCEC no alcanzaban los $150\text{-}200\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ necesarios para evaluar la permeabilidad de fármacos a través de ellas (Nicolazzo y col., 2006). A los 12 días de co-cultivo la monocapa de BCEC mostraba unos valores de TEER de entorno a $10\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ en aquellas monocapas donde no se habían aumentado los niveles de cAMP, y $30\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ en aquellas que sí se había aumentado (Figura 7Bi). En aquellas membranas en las que se co-cultivaron astrocitos y BCEC, las resistencias obtenidas a los tres días eran de unos $25\ \Omega\cdot\text{cm}^2$, a los seis días, la resistencia del co-cultivo aumentaba hasta unos $140\ \Omega\cdot\text{cm}^2$. Si en estos co-cultivos se incrementaba el cAMP, los valores de TEER alcanzaban los $185\ \Omega\cdot\text{cm}^2$ al noveno día, valores idóneos para realizar ensayos de permeabilidad (Nicolazzo y col., 2006).

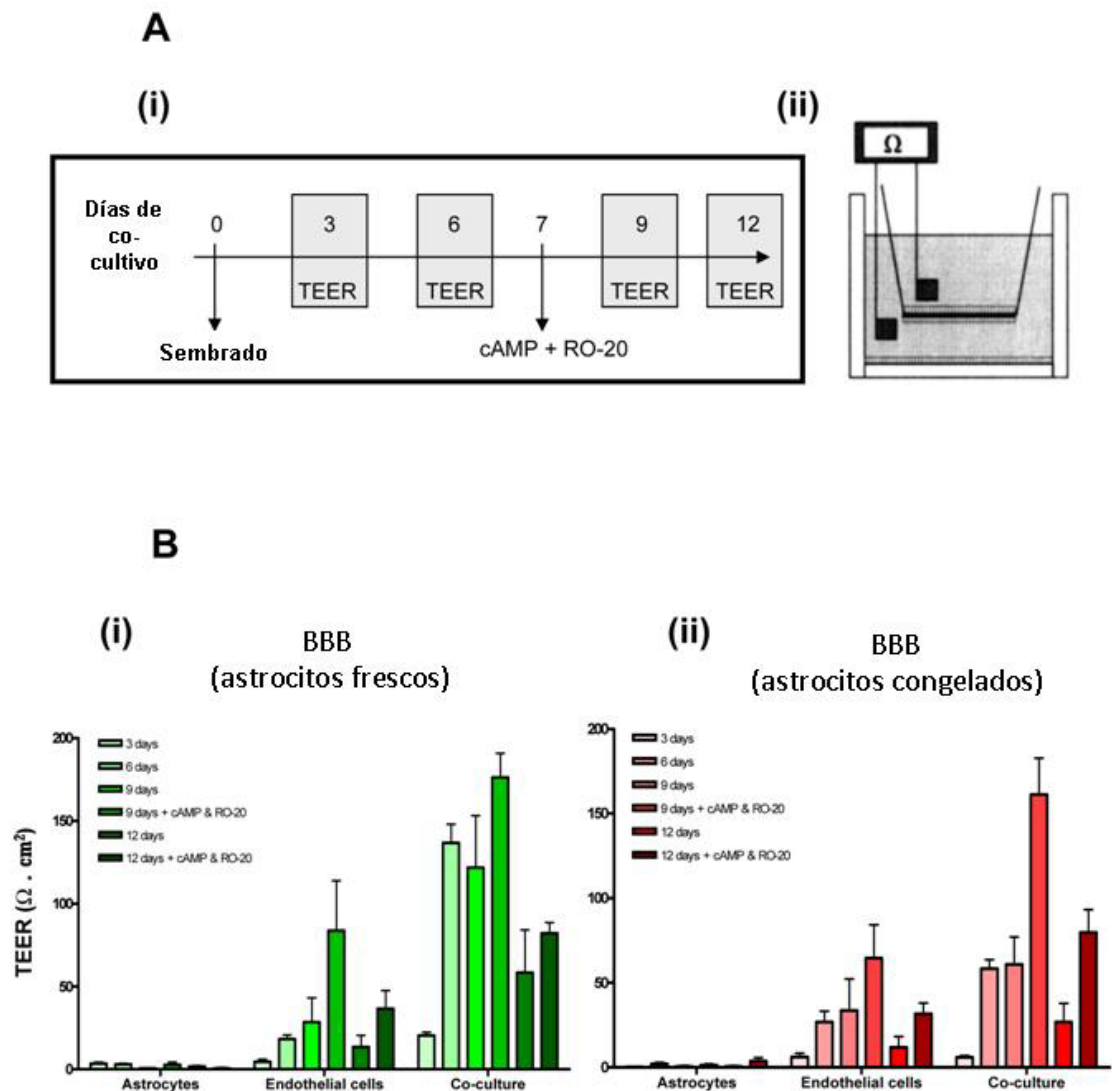


Figura 7. Valores de resistencia de los co-cultivos de BCEC y astrocitos corticales sobre Transwells®. Ai) Esquema que muestra la dinámica de los co-cultivos. A los días 3, 6, 9 y 12 se medía la TEER, y el séptimo día se añadía cAMP exógeno y RO-20 para aumentar los niveles de cAMP. Aii) Imagen que ilustra la medición de la TEER. Bi) Valores de TEER utilizando astrocitos frescos en los co-cultivos. Bii) Valores de TEER utilizando astrocitos descongelados en los co-cultivos.

Si no se utilizaba cAMP exógeno o RO-20, los valores de TEER se mantenían como en el sexto día ($130\text{-}140 \Omega\cdot\text{cm}^2$) (Figura 7Bi). Sin embargo, al igual que las monocapas de BCEC, los co-cultivos mostraban una vida media corta, disminuyendo a más de la mitad los valores de TEER a los doce días de co-cultivo (Figura 7Bi).

De forma paralela desarrollamos el modelo *in vitro* de BBB utilizando cultivos primarios de astrocitos corticales que previamente habían sido criopreservados (Figura 7Bii). En comparación con los co-cultivos que utilizaban astrocitos frescos, éstos mostraban la misma TEER a los tres días cultivo, pero a los 6 días alcanzaban valores inferiores (del orden de $60 \Omega\cdot\text{cm}^2$). Sin embargo, al noveno día de cultivo, después de añadir cAMP y RO-20, se alcanzaban unos valores de $170 \Omega\cdot\text{cm}^2$, siendo suficientes para realizar ensayos de permeabilidad (Figura 7Bii). El incremento de cAMP era fundamental en estos co-cultivos, ya que sin él, los valores de TEER alcanzados se mantenían alrededor de $60 \Omega\cdot\text{cm}^2$. Como era de esperar, a los doce días de cultivo los valores de resistencia disminuían considerablemente (Figura 7Bii).

1.4. Discusión

La integridad y fenotipo de ambos tipos celulares cultivados por separado fue la esperada. En los cultivos de BCEC pudimos apreciar que existía un reclutamiento de la proteína ZO-1 a la membrana plasmática cuando las BCEC estaban confluentes en cultivo. Sin embargo, aunque la translocación a la membrana de ZO-1 era indicativa de la formación de uniones estrechas entre las BCEC, esta monocapa no poseía las características de impermeabilidad que adquieren las BCEC de la BBB, como demostramos posteriormente. Así mismo, el grado de confluencia de las BCEC influía sobre la organización del citoesqueleto de actina. Cuando las BCEC se sembraban a una densidad baja, el citoesqueleto de actina formaba estructuras como lamelipodios o filopodios. En cambio, a una densidad elevada las BCEC experimentaban un refuerzo de la actina cortical, probablemente a causa de la formación de uniones estrechas entre ellas, y debido a un diálogo entre las RhoGTPasas Rho y Rac. Esto guarda relación con el hecho de que las proteínas que participan en la formación de las uniones estrechas (ZO-1, occludinas, claudinas) se unen directa o indirectamente a filamentos de actina (Abbott y col., 2006).

Las inmunofluorescencias de los co-cultivos mostraban que los astrocitos crecían en la parte inferior del filtro, por debajo de las BCEC. En el otro extremo, las BCEC formaban uniones estrechas tal y como confirmaba el marcaje de ZO-1. La eficacia de esas uniones estrechas estaba controlada por los pies astrocitarios que se introducen por los poros de la membrana,

contactan con las BCEC y liberan los factores solubles necesarios para que las BCEC adquirieran además de la morfología, la funcionalidad de las BCEC de la BBB (Abbott y col., 2006).

El mimetismo de los co-cultivos con la BBB se evaluó mediante el grado de compactación celular que presentaban. Esta propiedad se evaluó mediante la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). Como cabía esperar, los astrocitos al ser células que no forman uniones estrechas entre ellas, exhibían valores de TEER casi nulos. Las monocapas de BCEC formaban uniones estrechas en condiciones de confluencia, tal y como habíamos comprobado mediante inmunofluorescencias de monocultivos de BCEC. Sin embargo, los valores de TEER indicaban que aunque formaran uniones estrechas, las BCEC por si mismas no eran capaces de alcanzar una compactación comparable a la observada en la BBB. En los co-cultivos los valores de TEER eran mucho más elevados. Al noveno día de cultivo se obtuvieron valores máximos que oscilaban entre los 150-200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, suficientes para poder considerar el co-cultivo como un modelo *in vitro* que reproducía las propiedades selectivas en el transporte de la BBB. Estos resultados corroboraban que los astrocitos eran esenciales para obtener una correcta compactación de las BCEC (Rubin y Staddon 1999), y además, que todos aquellos estudios en los cuales solamente se utilizaba una monocapa de BCEC como modelo *in vitro* de la BBB, no eran representativos (Haorah y col., 2007). Adicionalmente, los valores de TEER de estos co-cultivos corroboraban que el incremento de las concentraciones de cAMP en las BCEC provocaba un aumento de la compactación de la monocapa (Gaillard y col., 2001). Sin embargo, el gran inconveniente de los co-cultivos es su vida media. Tres días después de alcanzar los valores máximos de TEER, la resistencia disminuía a más de la mitad, dejando los co-cultivos inservibles para ensayos de permeabilidad con cualquier agente. Una línea a explorar en un futuro, es elucidar el modo por el cual aumentar la estabilidad de este co-cultivo en el tiempo. Existen estudios en los cuales, una vez alcanzada la confluencia las BCEC se cultivan sin suero y se les añade hidrocortisona, consiguiendo una vida media más larga en la que poder usar el co-cultivo (Nitz y col., 2003).

Los co-cultivos en los cuales se utilizaron astrocitos previamente congelados alcanzaban en el noveno día de co-cultivo, valores máximos similares a los co-cultivos que se componían de astrocitos frescos, y por tanto adecuados para considerar que representaban las propiedades de la BBB. No obstante, las mediciones en los días previos nos indicaban que estos co-cultivos carecían de compactación suficiente. Esto nos indicaba que el aumento de cAMP es esencial en los co-cultivos que utilizan los astrocitos criopreservados.

En todos estos experimentos las BCEC utilizadas eran suministradas por una casa comercial. Ello implicaba un número muy limitado de células y un gasto económico elevado. Por lo tanto, un punto a tener en cuenta es el poder obtener las BCEC directamente de cultivos primarios de

cerebros bovinos, lo cual nos aportaría una cantidad de células mucho más elevada las cuales podrían incluso criopreservarse (Martínez-Estrada y col., 2003). Sin embargo, la puesta a punto de todo ello es logísticamente compleja.

Otra utilidad que podría tener este modelo *in vitro* de la BBB relacionado con los desórdenes relacionados con el alcoholismo fetal (DRAF), sería el estudio de la integridad de la BBB en la exposición a etanol y como poder prevenirlo. El etanol es un conocido perturbador de la BBB (Haorah y col., 2005), quizás alguno de los compuestos que describimos en esta tesis, como análogos del ácido lisofosfatídico (LPA) o los *Silver Atomic Clusters* (AgAQC)s son capaces de mitigar la pérdida de permeabilidad y la consecuente perturbación de la integridad de las células que componen la BBB.

2. Resultados no publicados

A continuación mostramos una serie de resultados los cuales no están incluidos en ninguno de los trabajos presentados en el apartado de resultados. Sin embargo, estos datos pueden ayudar a resolver ciertas dudas o cuestiones que surjan durante la lectura de la tesis.

2.1. Metabolización del etanol en los astrocitos

Los efectos de la exposición fetal a etanol pueden producirse por el etanol directamente o por sus metabolitos. El etanol se metaboliza por dos vías, la oxidativa y la no oxidativa. La oxidativa implica la oxidación del etanol a acetaldehído (AA) mediante tres enzimas: alcohol deshidrogenada (ADH), citocromo P450 (CYP2E1) y catalasa. La ADH, presente en el citosol, convierte el etanol a AA. Esta reacción conlleva una reducción del dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺) a NADH. Por otro lado, la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas, que requieren de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para oxidar el alcohol. Finalmente, CYP2E1, presente principalmente en los microsomas, asume un papel importante en el metabolismo de etanol a acetaldehído a concentraciones elevadas de etanol. Posteriormente, el AA se metaboliza principalmente por la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) en la mitocondria para formar acetato y NADH. El otro metabolismo del etanol (el no oxidativo) es mínimo y comprende dos vías. Una que concluye con la formación de moléculas llamadas ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs), de la reacción del alcohol con ácidos grasos;

y la otra que lleva a la formación de fosfatidiletanol. Ambos productos de la vía no oxidativa requieren la enzima fosfolipasa D (PLD) (Laposata, 1999), que utiliza fosfolípidos (fosfatidilcolina principalmente) para generar ácido fosfatídico (PA). La alteración de esta vía es crítica para la comunicación y señalización celular. Por ello, una cuestión previa a todos nuestros resultados era elucidar si la naturaleza de este conjunto de alteraciones que observábamos en el citoesqueleto de actina de los astrocitos expuestos crónicamente a etanol estaban ocasionadas por el etanol o por el AA, producto mayoritario del metabolismo oxidativo (el principal) del etanol con una gran capacidad citotóxica (Takeuchi y Saito, 2005). La principal vía de metabolización extrahepática del etanol es a través de la alcohol deshidrogenasa (ADH), concretamente las isoformas ADH1 y ADH4. Otras como la vía del CYP2E1 o la vía de la catalasa juegan un papel secundario en la metabolización del etanol. Por ese motivo, decidimos realizar ensayos enzimáticos para medir la actividad de ADH1 (Figura 8) y ADH4 (Figura 9) en cultivos primarios de astrocitos. Estos experimentos se realizaron comparando los astrocitos con células H4IIEC, línea celular derivada de hematomas humanos, que presentan actividad ADH.

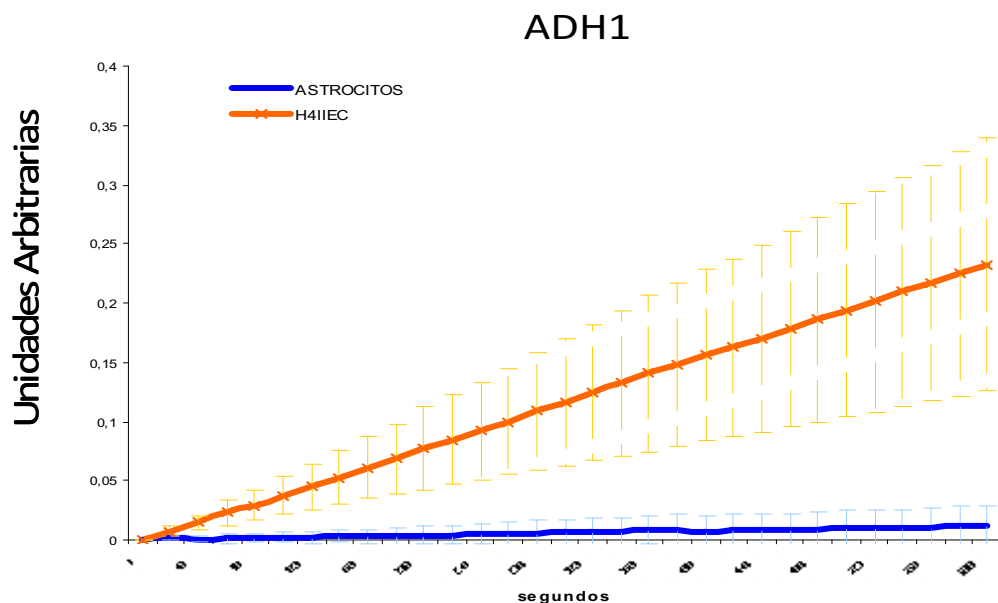


Figura 8. Actividad de ADH1 en astrocitos corticales. Actividad enzimática de la isoforma ADH1 en cultivos primarios de astrocitos y en células H4IIEC.

La actividad enzimática de ADH1 mostrada en los astrocitos era prácticamente nula. Sin embargo, las células H4IIEC mostraban un incremento constante de la actividad ADH1 (Figura 8).

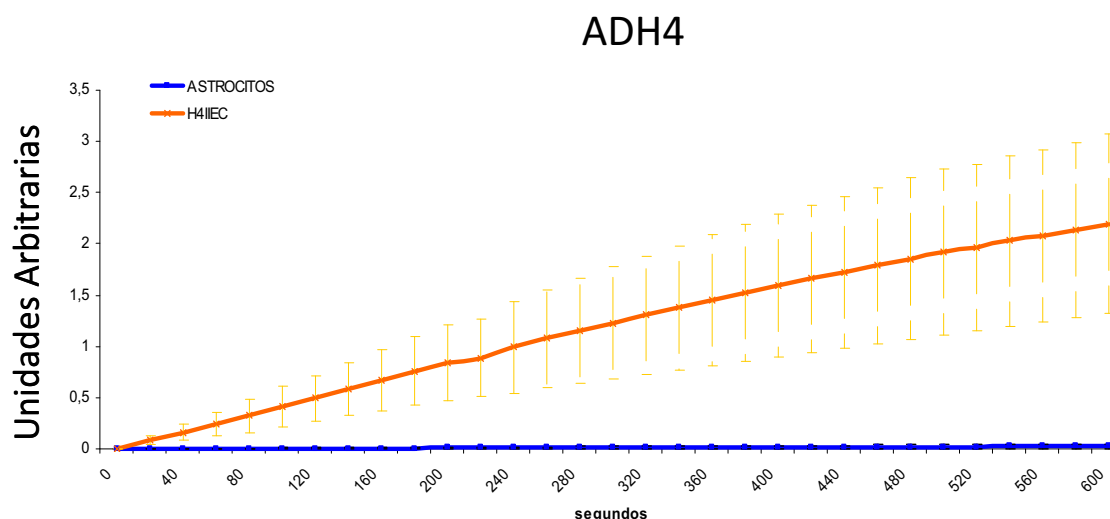


Figura 9. Actividad de ADH4 en astrocitos corticales. Actividad enzimática de la isoforma ADH4 en cultivos primarios de astrocitos y en células H4IIEC.

En cuanto a la isoforma ADH4, la actividad enzimática mostrada en los astrocitos era prácticamente nula. Sin embargo, las células H4IIEC presentaban, de nuevo, un aumento constante de la actividad ADH4.

Por lo tanto, si los astrocitos corticales de rata no presentan actividad ADH (la principal vía de metabolización del etanol a AA) se puede afirmar que prácticamente no son capaces de metabolizar el etanol a AA. En tal caso, el poco AA que puedan generar será obtenido por las otras dos vías, CYP2E1 y catalasa (Eysseric y col., 1997, 2000). Además, cultivos primarios de astrocitos marcados con faloidina (compuesto que se une a los filamentos de actina) nos indicaban que astrocitos expuestos crónicamente (7 días) a AA (200 y 300 μM) no mostraban alteraciones en la organización del citoesqueleto de actina (Figura 10).

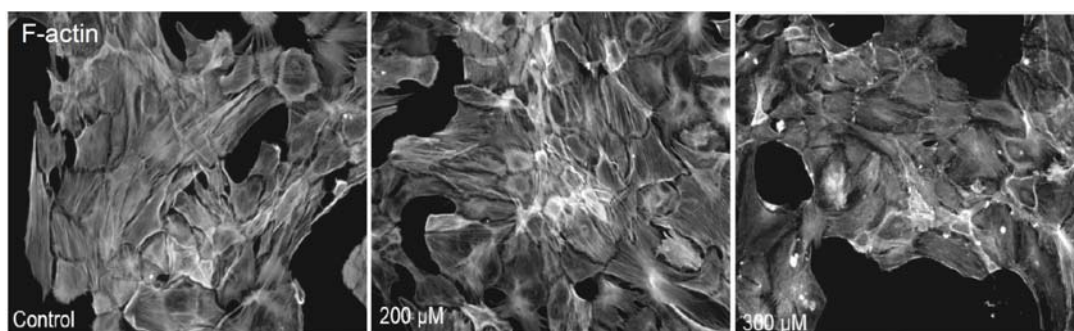


Figura 10. Exposición crónica a AA en astrocitos corticales. Organización del citoesqueleto de actina visualizada por marcaje de faloidina en astrocitos corticales expuestos crónicamente a 200 y 300 μM de AA.

Por lo tanto, aunque los astrocitos sean capaces de producir a través del CYP2E1 o la catalasa, pequeñas cantidades de AA, éste no sería capaz de producir las alteraciones en la organización

del citoesqueleto de actina. Así pues, se puede afirmar que las alteraciones que observamos en la organización del citoesqueleto de actina posteriormente a la exposición crónica a etanol son debidas principalmente al etanol y no al AA.

2.2. Actividades RhoGAP y RhoGEF en astrocitos expuestos a etanol

Nuestros resultados indican que el tratamiento con ácido lisofosfatídico (LPA) en el último día de exposición a etanol restaura las reorganizaciones en el citoesqueleto de actina (Tomas y col., 2003; Martínez y col., 2007). Esta restauración era consecuencia de un restablecimiento de los niveles de RhoA-GTP (Martínez y col., 2007). Recientemente, hemos observado que los niveles de RhoA-GTP se regularizaban gracias a de una normalización de la actividad total RhoGAP que el etanol estaba perturbando (Figura 11). Sorprendentemente, el tratamiento con LPA por sí mismo (sin la exposición a etanol) no disminuía la actividad RhoGAP respecto a astrocitos control (Figura 11).

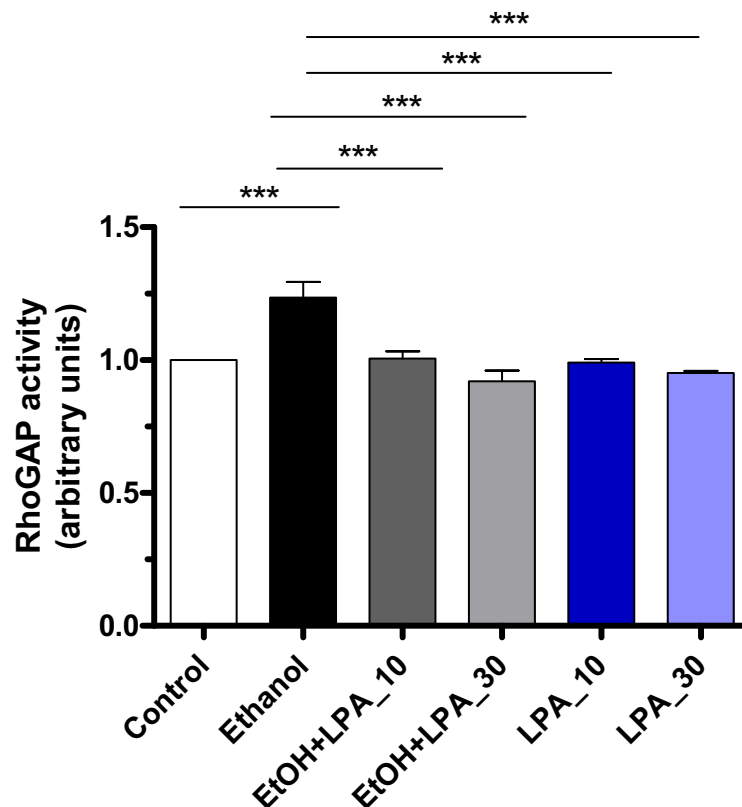


Figura 11. Actividad RhoGAP total en astrocitos corticales. El gráfico nos muestra la actividad RhoGAP en astrocitos: 1) control, 2) expuestos a etanol, 3) expuestos a etanol y tratando el último día durante 10 o 30 minutos, y 4) no expuestos a etanol y tratados con LPA el último día durante 10 y 30 minutos. EtOH: etanol, LPA: ácido lisofosfatídico

El LPA estimula la actividad RhoGEF a través de receptores acoplados a proteínas G heterotriméricas (Buschbaum 2007) y resultados propios (Figura 12). Por lo tanto, una explicación a todo ello podría ser que el LPA que actuase aumentando la actividad RhoGEF y sólo disminuyera el aumento de actividad RhoGAP inducido por el etanol, y que no fuese capaz de reducirla por debajo de un umbral de actividad basal. Parece ser pues, que el etanol y el LPA estarían actuando por dos vías distintas, a través de RhoGAPs y RhoGEFs, respectivamente, regulando así la actividad de RhoA. Por eso, en condiciones control, el LPA no sería capaz de disminuir la actividad RhoGAP basal si no existiese un incremento previo de la actividad RhoGAP.

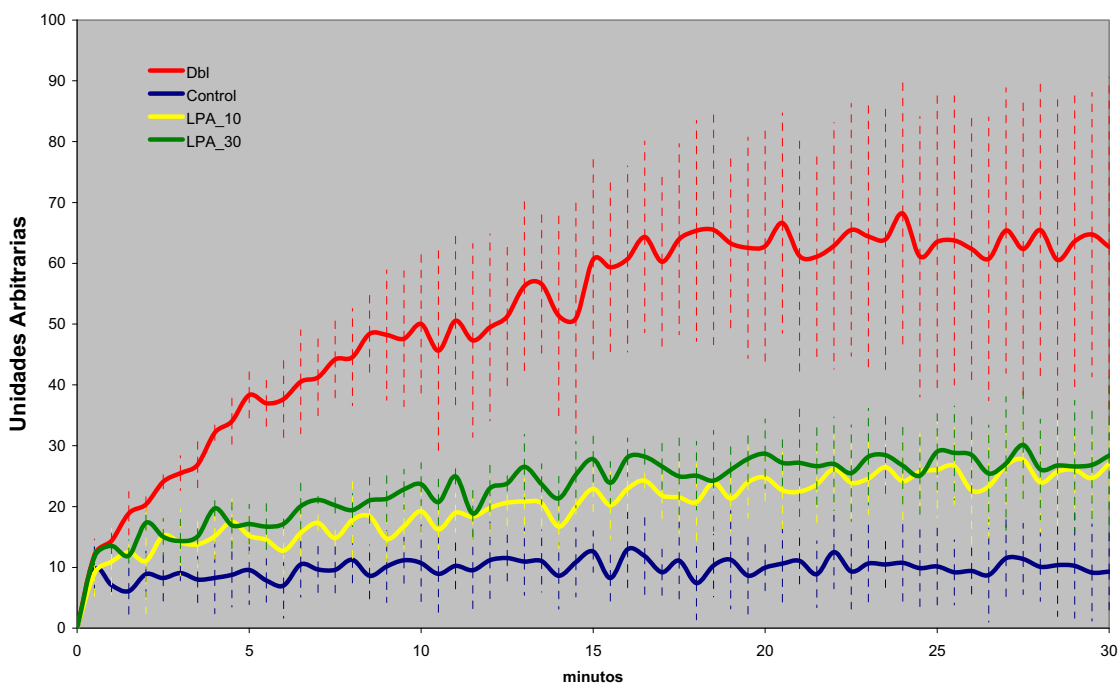


Figura 12. Actividad RhoGEF total en astrocitos corticales. El gráfico nos muestra la actividad RhoGEF en astrocitos control y tratados con LPA el último día con LPA durante 10 y 30 minutos. Dbl, dominio de las proteínas RhoGEF, utilizado como control positivo

3. Material y métodos

3.2. Reactivos utilizados

A continuación se detallan los distintos reactivos utilizados, así como, la concentración de uso y procedencia de los mismos.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración de uso</i>	<i>Procedencia</i>
AgAQCs	0,1 – 10 µg/ml	Nanogap
Butanol	25 mM	Merck
Etanol	30 mM, 100 mM, 200 mM y 500 mM	Merck
H ₂ O ₂	250 µM y 500 µM	Merck
Latrunculina B	500 nM	Calbiochem
LPA	0,5 mg/mL	Sigma-Aldrich
Metanol	50 mM	Merck
NAD ⁺	2,4 mM y 4 mM	Sigma
RO-20	17,5 µM	Calbiochem
Estaurosporina	1 µM	Sigma-Aldrich
γ-[³² P]-GTP	5 µCi	Hartmann Analytics

3.3. Lista de anticuerpos utilizados

La siguiente tabla muestra los anticuerpos empleados para inmunofluorescencia (IF) o *western blotting* (WB), indicando la especie y la dilución de trabajo utilizada para cada aplicación.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie</i>	<i>Dilución de trabajo</i>		<i>Procedencia</i>
		<i>IF</i>	<i>WB</i>	
Actina	Conejo	1/25000	1/5000	Cytoskeleton Inc.
Alexa 488	Conejo	1/250	-	Invitrogen
Caspasa - 3	Conejo	1/100	1/1000	Cell Signaling
Caspasa – 3- cleaved	Conejo	1/100	1/1000	Cell Signaling
Cdc42	Ratón	-	1/1000	BD
Cy3	Conejo	1/250	-	Jackson Laboratories
Cy2	Ratón	1/50	-	Jackson Laboratories
Cy3	Ratón	1/50	-	Jackson Laboratories
GFAP	Ratón	1/500	1/5000	Sigma-Aldrich
Mouse-HRP	Ratón	-	1/3000	Promega
p120RasGAP	Conejo	-	1/1000	Santa Cruz
p190	Ratón	1/50	1/2000	BD
p190B	Ratón	1/50	1/2000	BD
Rabbit-HRP	Conejo	-	1/3000	Promega

<i>Anticuerpo</i>	<i>Especie</i>	<i>Dilución de trabajo</i>		<i>Procedencia</i>
		<i>IF</i>	<i>WB</i>	
Rac1	Ratón	-	1/1000	BD
RhoA	Ratón	-	1/1000	BD
RhoA-GTP	Conejo	-	1/1000	NewEast Biosciences
Rho-GDIs	Conejo	-	1/1000	Santa Cruz
α -tubulina	Ratón	-	1/50000	Sigma-Aldrich
ZO-1	Ratón	1/100	-	Zymed Laboratories

3.4. Lista de marcadores utilizados

A continuación se detallan los distintos marcadores utilizados, así como, la estructura que identifican, dilución de trabajo y procedencia de los mismos.

<i>Marcador</i>	<i>Estructura identificada</i>	<i>Dilución de trabajo</i>	<i>Procedencia</i>
DAPI	Núcleo	1/500	Calbiochem
Faloidina-Comarin	Filamentos de actina	1/250 (0,02 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Faloidina-FITC	Filamentos de actina	1/500 (0,02 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Faloidina-TRITC	Filamentos de actina	1/500 (0,02 mg/ml)	Sigma-Aldrich

3.5. Lista de plásmidos utilizados

A continuación se detallan los distintos vectores de expresión utilizados, así como, la resistencia y procedencia de los mismos.

<i>Plásmido</i>	<i>Vector</i>	<i>Resistencia</i>	<i>Procedencia</i>
GST-PBD	pGEX	Ampicilina	Dr. Piero Crespo (CSIC, Santander)
GST-RBD	pGEX	Ampicilina	Dr. Piero Crespo (CSIC, Santander)
GST-RhoA	pGEX	Ampicilina	Dr. Piero Crespo (CSIC, Santander)
GST-RhoAQ63L	pGEX	Ampicilina	Dr. Keith Burrige (Univ. North Carolina, Chapel Hill)
p190RhoGAP-HA	pKH3	Ampicilina	Dr. Piero Crespo (CSIC, Santander)
p190RhoGAP-RA	pEGFP	Kanamicina	Dr. Keith Burrige (Univ. North Carolina, Chapel Hill)

3.6. Métodos utilizados

Cultivos celulares

Las células NRK, Hela, 293T y Vero crecen en DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) completo: suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% (volumen/volumen) inactivado, penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml), piruvato y L-glutamina (10 mM). Las células crecen en atmósfera saturada de agua, 5% de CO₂ y a 37°C.

Todo el procedimiento debe realizarse con material estéril, guantes y el medio de cultivo debe estar a 37°C.

Los astrocitos se aíslan del cerebro de 6 ratas P1 o P2 (de 1 o 2 días de edad), se calculan que se necesitan un par de ratas por flascón (p75, de 75 cm²) de cultivo. Previamente debemos preparar el *Krebs- Ringer Buffer* (KRB) 10X (para 500 ml: 35,35 g de NaCl, 1,8 g de KCl, 0,83 g de KH₂PO₄, 10,7 g de NaHCO₃ y 12,85 g de glucosa). El mismo día del cultivo preparar las

siguientes soluciones, solución 1: 50 ml KRB 1X + 0,15g BSA + 0,4 ml MgSO₄ al 3,8 %; solución 2: 10 ml de solución 1 + 2,5 mg de tripsina; solución 3: 10 ml solución 1 + 0,8 mg DNasa + 5,2 mg de SBTI + 0,1 ml de MgSO₄ al 3,8 %; solución 4: 8,4 ml de solución 1 + 1,6 ml de solución 3; solución 5: 5 ml de solución 1 + 40 µl de MgSO₄ al 3,8% + 6 µl de CaCl₂ al 1,2 %. De los cerebros de rata se recoge la corteza cerebral, se limpian las meninges, todo ello en DMEM sin suero (con HEPES 50 mM) a 4°C. Homogeneizar el córtex, añadirlo a la solución 1 y centrifugar 5 segundos a 1000 rpm. Descartar el sobrenadante, añadir la solución 2 y agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Añadir la solución 4 y centrifugar 5 segundos a 1000 rpm. Descartar sobrenadante y añadir dos volúmenes de una pipeta Pasteur de la solución 3. Resuspender el pellet y homogeneizar la suspensión con una pipeta Pasteur. A la suspensión homogeneizada se le añade la solución 5 y se centrifuga 5 minutos a 1000 rpm. El pellet se resuspende en DMEM completo (con 25 mM HEPES) y se siembra en tres flascos p75. No deben moverse los flascos hasta el tercer día, justo entonces se realiza un cambio de medio de cultivo. A los seis días de cultivo se agitan los flascos a 80 rpm durante toda la noche, y a la mañana siguiente se realiza un lavado con PBS y se cambia de nuevo el DMEM. Una vez los astrocitos llegan a confluencia, se subcultivan en flascos p75 recubiertos de Poli-D-Lisina. La pureza de los cultivos de astrocitos se evaluó por inmunofluorescencia con anti-proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que indicó que en los cultivos el 90-95% eran astrocitos. Todos los experimentos con ratas fueron aprobados por el comité de revisión institucional adecuado y se actuó en estricto cumplimiento de la Guía de la Comunidad Europea para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

Exposición crónica a etanol de los cultivos

Las células se expusieron a etanol a concentraciones similares a las encontradas en la sangre de mujeres embarazadas consumidoras de alcohol (Eckardt y col., 1998) durante al menos 7 días (tratamiento crónico). El etanol se añadía una vez cada 24 horas y el medio de cultivo se cambiaba cada dos días.

Tratamiento de los cultivos con LPA.

Los cultivos de astrocitos tratados con etanol durante 6 días se incubaron primero en medio con bajo contenido en suero durante 12-18 h y luego en un medio exento de suero durante al menos 2 h. Seguidamente, las células se incubaron con LPA (1 µM) durante 90 min.

Modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica (BBB)

Los astrocitos se aislaron del cerebro de una rata, P1 o P2 (de 1 o 2 días de edad), se recogieron la corteza cerebral y se cultivaron los astrocitos de esta región tal y como se ha explicado previamente. En los astrocitos subcultivados, una vez confluentes, se recogió el medio condicionado por astrocitos (MCA) a días alternos durante dos semanas. El MCA se filtraba (0,2 μm), y a continuación se almacenaba a -20 °C.

Las células endoteliales de capilares bovinos (BCEC) procedían de una empresa que comercializaban células endoteliales bovinas obtenidas de cultivos primarios (Cambrex, bMVEC-B, Cat. AC-2509). Se cultivaron en p75 recubiertos con colágeno y fibronectina con un 50% de medio de cultivo, y un 50% del MCA. Cuando llegaron al 70 % de confluencia (a los 4 o 5 días) pasaron a ser utilizadas para el co-cultivo.

El co-cultivo se llevó a cabo en filtros Transwells® (Corning Star, Cat. 93413) recubiertos de colágeno y fibronectina. Primero se cultivaron los astrocitos en la parte inferior del filtro, y tres días después se sembraron las BCEC en la parte superior del filtro. Durante los nueve días determinamos la Resistencia Eléctrica Trans-Endotelial (TEER) del co-cultivo. Con el valor de la TEER supimos si las uniones estrechas entre BCEC, se habían formado correctamente.

Medición de la TEER

La TEER ($\Omega\cdot\text{cm}^2$) generada por las capas de BCEC cultivadas fue utilizada para evaluar la compactación de la monocapa. Estas mediciones se realizaron empleando un voltímetro con electrodos conocido como el sistema Millicell®-ERS (Millipore, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Todos los valores, previamente corregidos por la resistencia del filtro y el medio, se reportaron por el diámetro efectivo de membrana.

Transfección transitoria

Los plásmidos fueron transfectados en células sembradas sobre cubreobjetos o en placas de cultivo al 80% de confluencia. Como método de transfección se empleó Lipofectamine (Invitrogen) usando el protocolo recomendado por el fabricante, o el método del fosfato de calcio tal y como se describen previamente en Guegan y col., 2008.

Inmunofluorescencia

Las inmunocitoquímicas se realizan en células sembradas sobre cubreobjetos, al 50-70% de confluencia. La fijación se realiza en paraformaldehído al 4% disuelto en PBS durante 10 min o alternativamente en metanol a -20°C durante 5 segundos. Después se volvió a lavar con PBS y

se bloqueó los grupos aldehído con NH_4Cl (50 mM) en PBS durante 20 min. Seguidamente, las células fueron sometidas a solución permeabilizante conteniendo PBS, 1% de albúmina sérica bovina (BSA) como agente bloqueante y 0.1% de saponina como agente permeabilizante, durante 10 minutos. El anticuerpo primario se incubó 60 min. a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, tras lo cual se lavó con PBS (3x5 min.). La detección del anticuerpo primario se realizó con anticuerpos anti-conejo o anti-ratón (Fragmentos Fab'2) conjugados con fluorocromos. Estos se diluyeron en PBS con BSA al 1% a la concentración de trabajo, y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se lavaron los cubreobjetos con PBS (3x5 min) y se montaron en Mowiol. Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y con una cámara Orca-ER CCD (Hamamatsu Photonics, Japón) o un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany).

Inmunofluorescencia de co-cultivos

Las inmunocitoquímicas se realizaron en células sembradas sobre Transwells®. La fijación se realizó en paraformaldehído al 3% y sacarosa al 2% disuelta en PBS al 0,1M durante 15 min. Después se volvió a lavar con PBS tres veces durante 10 minutos. Se bloquearon los grupos aldehído con glicina a 20mM disuelta en PBS durante 20 min. Seguidamente, las células fueron sometidas a solución permeabilizante conteniendo PBS y 0.2% de Tritón X-100 durante 10 min. Se volvió a lavar las membranas con PBS durante 5 minutos. Se bloquearon durante 20 minutos con BSA al 1% en PBS. El anticuerpo primario se incubó 60 min a temperatura ambiente. ZO-1 se aplicó en la zona superior de las membranas, mientras que la zona inferior se incubó con GFAP. Después se lavó con PBS (3x5 min). La detección del anticuerpo primario se realizó con anticuerpos anti-conejo o anti-ratón (Fragmentos Fab'2) conjugados con fluorocromos. Estos se diluyeron en PBS con BSA al 1% a la concentración de trabajo, y se incuban durante 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las membranas con PBS (3x5 min) y se dejaron secar unos 30 minutos. Se montaron en Mowiol cubiertos por cubreobjetos de 12 mm de diámetro, añadiendo separadores (laca de uñas o celo) para evitar el aplastamiento de las células. Las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX60 y con una cámara Orca-ER CCD (Hamamatsu Photonics, Japón) o un microscopio confocal Leica TCS SL (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germany).

Visualización del citoesqueleto de actina

Finalizados los tratamientos, las células crecidas en cubreobjetos de vidrio se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con saponina 0,1% y BSA 1%. Seguidamente, se incubaron con faloidina marcada con un fluorocromo (TRITC, FITC o Comarin) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Inmunotransferencia

Los extractos celulares se prepararon a partir de de placas de cultivo de 100 mm, añadiendo 300 µl de tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, pH 7,4) con inhibidores de proteasas (aprotinina, leupeptina y pepstatina A) y fosfatasa (ortovanadato de sodio y PMSF). Las muestras se incubaron 10 min en hielo, luego se sonicaron suavemente (dos rondas de 5 segundos por muestra) y finalmente se centrifugaron (1000g, 10 min a 4 °C). La concentración proteica se determinó con el *DC protein Assay* de Bio-Rad. Se cargó igual cantidad de proteína por extracto con tampón de carga 5X (con 10% de β-mercaptoetanol), y se corrió una electroforesis en un gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 10% (v / v). Seguidamente se transfirió (90 min, 100 mV) en una membrana de nitrocelulosa (Whatman, Maidstone, Kent, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con 5% BSA / tampón TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1% de Tween-20) durante 1 h, posteriormente se incuban con anticuerpos primarios (disueltos en PBS-0,002% de azida sódica) durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios de IgG-HRP durante 1 h en 5% de BSA / tampón TBST. Después de varios lavados, las membranas se incubaron durante 4 minutos a temperatura ambiente con el reactivo *Western Blotting Luminol Reagent* (Santa Cruz, Delaware, CA, EEUU). Las bandas se visualizaron por la exposición de la membrana a Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia), y sus intensidades se midieron por densitometría de la película usando el software Image J.

Inmunoprecipitación

Extractos de células se preparan añadiendo 500 µl de tampón RIPA modificado (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 137 mM NaCl, 10% de glicerol, 0,05% SDS, 0,5% Triton X-100, 0,1% desoxicolato de sodio, 2 mM EDTA) y procesadas como se ha indicado antes. Igual cantidad de extracto proteico por muestra se incubó durante la noche con el anticuerpo correspondiente y con 50 µl de perlas de sefarosa con proteína A. Al día siguiente, las perlas se lavaron tres veces el

tampón RIPA modificado. Las proteínas se eluyeron de las perlas mediante la adición de 20 μ l de tampón de carga de 5X (con 10% de β -mercaptoetanol)

Ensayos *Pull-Down*

Extractos celulares se prepararon añadiendo 500 μ l de tampón de *Pull-down* (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 1 mM DTT) y procesadas como se ha indicado antes. Los lisados se incubaron 2 horas a 4 °C con 50 μ l de perlas de agarosa con glutation. A continuación, los lisados celulares se centrifugaron y el sobrenadante se recogió y se incubó durante toda la noche con 30 μ g de proteína de fusión (GST-PBD, GST-RBD) y 50 μ l de perlas de agarosa con glutation. Al día siguiente, las perlas se lavaron tres veces con tampón de *Pull-down*. Las proteínas se eluyeron de las perlas mediante la adición de 20 μ l de tampón de carga de 5X (con 10% de β -mercaptoetanol).

G-LISA™

Para medir la actividad de RhoA en extractos celulares se realizó un análisis cuantitativo colorimétrico utilizando la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Siguiendo las instrucciones del fabricante, los extractos de células se lisaron con el tampón del kit y se incubaron en micropocillos en los que el RBD estaba unido. La forma activa de RhoA se detectó mediante inmunodetección indirecta seguida de una reacción colorimétrica medida por absorbancia a 490 nm.

Actividad RhoGAP y RhoGEF

Para determinar la actividad total de RhoGAP, bacterias que expresaban GST-RhoA se purificaron mediante procedimientos estándar (García-Mata y col., 2006). Se incubaron GST-RhoA (3 g) con γ -[³²P]-GTP (5 μ Ci) durante 10 minutos a 30 °C. Para determinar la reacción de las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), el [³²P]-GTP-unido a RhoA se incubó con lisados de astrocitos expuestos o no a etanol en presencia de MgCl₂ (10 mM) a 30 °C durante 30 min (la cinética de la reacción fue verificada con muestras a diferentes tiempos). La mezcla de reacción se fraccionó posteriormente en molibdato sódico / isopropil acetato. Una muestra de la fase orgánica, indicadora de la hidrólisis de GTP, se analizó por centelleo.

Para determinar la actividad de RhoGAP p190A y p190B, las respectivas fracciones inmunoprecipitadas de células HEK293T fueron incubadas durante 15 min a 37 °C con lisados de astrocitos cultivados en ausencia o en presencia de etanol, previamente a la medición de la hidrólisis de GTP.

En el caso de las determinaciones de la actividad RhoGEF, se usó el RhoGEF™ Kit (Cytoskeleton) y fue utilizado según las instrucciones del fabricante.

Actividad ADH

La determinación de la actividad enzimática se llevó a cabo con un espectrofotómetro UV-VIS, de doble haz. La medida de la actividad enzimática se determinó a partir del incremento en la absorbancia a 340 nm, debido a la reducción del NAD⁺. En todos los ensayos, la actividad se determina a partir de la velocidad inicial en cubeta de vidrio de 1 ml y de 1 cm de paso óptico y a 25 °C. La actividad en presencia de alcoholes se determinó en tampón glicina 0,1M pH 10. La actividad ADH1 de rata se determinó con NAD⁺ 2,4 mM y etanol 10 mM. La actividad ADH4 de rata se midió de modo análogo al del caso anterior, pero empleando NAD⁺ 4 mM y etanol 500 mM.

Contenido de fosfoinosítidos

Los astrocitos se cultivaron en medio que contenía una concentración baja de inositol e incubados 3 días con 1 μCi / ml de myo-[2-3H-inositol]. Después de retirar el medio, las células fueron lavadas dos veces en PBS y los lípidos se extrajeron con cloroformo / metanol / HCl concentrado (100: 200: 1). Extractos clorofórmicos de lípidos (Bligh y Dyer, 1959) se evaporaron en un concentrador. Después de la adición de 20 mg fosfoinosítidos mixto como marcador, las muestras se aplicaron sobre placas de TLC y migraron usando metanol/cloroformo/NH₄OH/agua (48: 40: 5: 10). Las bandas de lípidos se visualizaron con vapores de yodo. Los fosfoinosítidos de los extractos se identificaron por comigración con estándares fosfoinositol (PI), fosfoinositol fosfato (PIP) y fosfoinositol bifosfato (PIP₂) y se cuantificaron por centelleo raspándolos de la placa.

Determinación de la concentración de etanol

La concentración de etanol en medio de cultivo se realizó mediante un método enzimático, utilizando la alcohol deshidrogenasa (ADH) de levadura y NAD⁺ como cofactor de la reacción. El etanol, el sustrato de la reacción, estuvo presente en el medio de cultivo. Así, la ADH oxidó el etanol del medio convirtiendo el NAD⁺ a NADH, el cual se midió a 340 nm en el espectrofotómetro. Como la reacción era equimolar, la producción de NADH era directamente proporcional a la oxidación de etanol, y por lo tanto a la concentración de etanol presente en el medio de cultivo.

Recuento de células

Contajes imparciales de las células se obtuvieron mediante la ayuda del programa *Computer Assisted Stereology Toolbox* (CAST) (Olympus, Denmark). Se contaron el número total de células (visualizado con el marcador nuclear DAPI) y células con una morfología redondeada (visualizados por tinción de faloidina).

Ensayo de F-/G- actina

Células NRK se homogeneizaron en tampón lisis (50 mM PIPES, pH 6,9, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5% (v / v) de glicerol, 0,1% Nonidet P40, 0,1% Triton X-100, 0.1% de Tween 200 , 1% de 2-mercaptoetanol y 0,001% antiespumante C) que contenía 250 nM de TRITC-faloidina. Los lisados se centrifugaron a 100.000g durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pellets contenían la fracción F-actina y el sobrenadante contenía la fracción de G-actina. Las muestras se analizaron por inmunotransferencia con anticuerpos anti-actina.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD), y se analizaron mediante *one-way* ANOVA seguida por las múltiples de Bonferroni, o con la prueba t de Student de dos colas (GraphPad Software, San Diego, California, E.E.U.U.). Una $p \leq 0,05$ fue considerada significativa.

4. Bibliografía de los anexos

- Abbott NJ, Romero IA. Transporting therapeutics across the blood-brain barrier. *Mol. Med. Today.* 1996; 2: 106–113.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7: 41-53.
- Audus KL, Ng L, Wang W, Borchardt RT. Brain microvessel endothelial cell culture systems. In *Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism*, editors. RT Borchardt, PI Smith, G Wilson. 1996; 13: 239–258. New York: Plenum
- Begley DJ. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther.* 2004; 104: 29-45.
- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37: 911-917.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1461: 347-357.
- Buschbaum RJ. Rho activation at a glance. *J Cell Sci.* 2007; 120: 1149-1152.
- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6: 650-661.
- Ciechanover A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6: 79-87.
- Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 695-698.
- Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, Romero IA, Hossain M, Rapp E, Janigro D. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008; 28: 312-328.
- de Boer AG, van der Sandt IC, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003; 43: 629-656.
- Demeuse P, Kerkhofs A, Struys-Ponsar C, Knoops B, Remacle C, van den Bosch de Aguilar P. Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes: a syngenic model to study the blood-brain barrier. *J Neurosci Methods.* 2002; 121: 21-31.
- Eckardt MJ, File SE, Gessa GL, Grant KA, Guerri C, Hoffman PL, Kalant H, Koob GF, Li TK, Tabakoff B. Effects of moderate alcohol consumption on the central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998; 22: 998-1040.
- el-Bacha RS, Minn A. Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 1999; 45: 15-23.
- Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Bessard G, Saxod R, Barret L. Characterization of the production of acetaldehyde by astrocytes in culture after ethanol exposure. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 1018-1023.

- Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Richard MJ, Daveloose D, Barret L. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol*. 2000; 21: 117-125.
- Gaillard PJ, de Boer AG. 2B-Trans technology: targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol*. 2008; 437: 161-175.
- Gaillard PJ, van der Sandt IC, Voorwinden LH, Vu D, Nielsen JL, de Boer AG, Breimer DD. Astrocytes increase the functional expression of P-glycoprotein in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Pharm Res*. 2000 Oct;17(10):1198-205.
- Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, Ringbom C, de Boer AG, Breimer DD. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci*. 2001; 12: 215-222.
- García-Mata R, Wennerberg K, Arthur WT, Noren NK, Ellerbroek SM, Burridge K. Analysis of activated GAPs and GEFs in cell lysates. *Methods Enzymol*. 2006; 406: 425-437.
- Guegan F, Tatin F, Leste-Lasserre T, Drutel G, Genot E, Moreau V. p190B RhoGAP regulates endothelial-cell-associated proteolysis through MT1-MMP and MMP2. *J. Cell Sci*. 2008; 121: 2054-2061.
- Haorah J, Heilman D, Knipe B, Chrastil J, Leibhart J, Ghorpade A, Miller DW, Persidsky Y. Ethanol-induced activation of myosin light chain kinase leads to dysfunction of tight junctions and blood-brain barrier compromise. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29: 999-1009.
- Haorah J, Schall K, Ramirez SH, Persidsky Y. Activation of protein tyrosine kinases and matrix metalloproteinases causes blood-brain barrier injury: Novel mechanism for neurodegeneration associated with alcohol abuse. *Glia*. 2008; 56: 78-88.
- Hendry SH, Jones EG, Beinfeld MC. Cholecystokinin-immunoreactive neurons in rat and monkey cerebral cortex make symmetric synapses and have intimate associations with blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983; 80: 2400-2404.
- Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin. Pharmacol. Ther*. 2005; 78: 260-277.
- Kim JA, Tran ND, Li Z, Yang F, Zhou W, Fisher MJ. Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26: 209-217.
- Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 50: 258-265.
- Laposata M. Fatty acid ethyl esters: nonoxidative ethanol metabolites with emerging biological and clinical significance. *Lipids*. 1999; 34: S281-285.
- Lee G, Dallas S, Hong M, Bendayan R. 2001. Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol. Rev*. 53(4): 569-596.
- Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *J. Drug Target*. 2004; 12: 635-641.
- Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog. Neurobiol*. 2005; 76: 22-76

- Martínez SE, Lázaro-Diéguez F, Selva J, Calvo F, Piqueras JR, Crespo P, Claro E, Egea G. Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol. *J. Neurochem.* 2007; 102: 1044-1052.
- Martínez-Estrada OM, Rodríguez-Millán E, González-De Vicente E, Reina M, Vilaró S, Fabre M. Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 2538-2544.
- Nicolazzo JA, Charman SA, Charman WN. Methods to assess drug permeability across the blood-brain barrier. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58: 281-293.
- Nitz T, Eisenblätter T, Psathaki K, Galla HJ. Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells in vitro. *Brain Res.* 2003; 981: 30-40.
- Pardridge WM. Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol.* 2005; 30: 57-70.
- Rist RJ, Romero IA, Chan MW, Couraud PO, Roux F, Abbott NJ. F-actin cytoskeleton and sucrose permeability of immortalised rat brain microvascular endothelial cell monolayers: effects of cyclic AMP and astrocytic factors. *Brain Res.* 1997; 768: 10-18.
- Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 11-28.
- Schinkel AH, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Borst P. Absence of the mdr1a P-Glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin, and cyclosporin A. *J Clin Invest.* 1995; 96: 1698-1705.
- Takeuchi M, Saito T. Cytotoxicity of acetaldehyde-derived advanced glycation end-products (AA-AGE) in alcoholic-induced neuronal degeneration. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29: 220S-224S.
- Tomás M, Lázaro-Diéguez F, Durán JM, Marín P, Renau-Piqueras J, Egea G. Protective effects of lysophosphatidic acid (LPA) on chronic ethanol-induced injuries to the cytoskeleton and on glucose uptake in rat astrocytes. *J Neurochem.* 2003; 87: 220-229.
- Wekerle H. Immune protection of the brain--efficient and delicate. *J Infect Dis.* 2002; 186: S140-144.