

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escola Tècnica Superior D'Enginyeria
Agronòmica I del Medi Natural

Grado en Biotecnología



**Papel de la autofagia y su regulación por mTOR en los
mecanismos moleculares implicados en la plasticidad
sináptica en el consumo de alcohol durante la
adolescencia**

TRABAJO FIN DE GRADO

Curso académico : 2019-2020

ALUMNO : Juan Camacho Roda

TUTORA CIPF : Consuelo Guerri Sirera

COTUTORA CIPF : María Pascual Mora

TUTOR UPV : Eduardo Bueso Ródenas

VALENCIA, JULIO 2020



Título : Papel de la autofagia y su regulación por mTOR en los mecanismos moleculares implicados en la plasticidad sináptica en el consumo de alcohol durante la adolescencia

Autor : Juan Camacho Roda

Localidad y fecha : Valencia, Julio 2020

Tutora CIPF: Consuelo Guerri Sirera

Cotutora CIPF: María Pascual Mora

Tutor académico : Eduardo Bueso Ródenas

Resumen

La adolescencia es un periodo de maduración del cerebro, en el que tienen lugar cambios plásticos y dinámicos, que hacen que el cerebro adolescente se especialice para llevar a cabo funciones superiores. Algunas áreas en las que se producen estos cambios estructurales son el hipocampo y la corteza prefrontal. La correcta maduración del cerebro es importante para llevar a cabo funciones como la memoria y el aprendizaje. Diferentes estudios demuestran la implicación de la autofagia en los procesos de maduración sináptica. La autofagia es un mecanismo celular que elimina material residual o componentes no funcionales, y su principal regulador es mTOR (*mammalian target of rapamycin*). En el sistema nervioso central, la autofagia es importante para el mantenimiento de las funciones neuronales, y las alteraciones en este proceso participan en enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias. Inhibidores de mTOR, como la rapamicina, se han utilizado como tratamiento puesto que disminuyen la inflamación y la progresión de la enfermedad. El alcohol es un compuesto neurotóxico, y se ha demostrado que su abuso durante la adolescencia produce neuroinflamación, alteraciones sinápticas y de mielina, daño neural y cambios en la memoria y aprendizaje. Hay que destacar, que la autofagia tiene lugar en diferentes regiones cerebrales (ej. corteza prefrontal, hipocampo), donde participa durante la remodelación cerebral hasta llegar al cerebro adulto (Pascual et al., 2019). Estudios del laboratorio de Patología Celular del CIPF han sido pioneros en demostrar que el abuso de alcohol en forma de atracón o “*binge drinking*” durante la adolescencia altera los procesos de autofagia que se asocian con cambios en los niveles de proteínas sinápticas estructurales excitatorias, como PSD-95 y SHANK3 (Montesinos et al., 2018). Considerando la participación de la autofagia en la plasticidad sináptica y el papel del factor de transcripción CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*) en mecanismos implicados en procesos cognitivos, la hipótesis de este trabajo es evaluar si el abuso de alcohol durante la adolescencia altera la vía de CREB y si estos efectos están mediados a través de mTOR.

Metodología: Se usaron ratones adolescentes hembras y machos tratados con o sin alcohol en presencia o ausencia del inhibidor de mTOR, rapamicina, administrado previamente a la dosis de alcohol. El etanol (3g/kg) se administra intraperitonealmente a ratones de 30 días de edad durante 2 días consecutivos seguidos de 2 días de descanso durante 14 días. En estos animales, se evaluó la expresión de p-CREB, p-ERK y p-Akt en hipocampo y corteza prefrontal mediante *western-blot*. Los resultados demuestran que el tratamiento de etanol disminuyó la fosforilación de CREB y ERK en hipocampo y corteza prefrontal en ratones adolescentes hembras y machos, mientras que no observaron cambios en Akt. Además, la administración de rapamicina fue capaz de revertir estos cambios inducidos por el consumo de alcohol durante la adolescencia. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el mecanismo de la autofagia a través de mTOR podría

estar participando en las alteraciones producidas por el consumo de alcohol durante la adolescencia en la vía de señalización de CREB, lo que podría conllevar a cambios en la plasticidad sináptica y en la memoria y el aprendizaje.

Palabras clave: Adolescencia, tratamiento de alcohol en atracón, autofagia, mTOR, plasticidad sináptica, CREB.

Abstract

Adolescence is an important brain maturation period in which plastic and dynamic processes take place, allowing the adolescent brain to specialize to perform more complex functions. Structural remodeling occurs in a variety of brain regions, including the hippocampus and the prefrontal cortex. The correct brain maturation is critical for a correct development of learning and memory processes. Increasing evidence demonstrates the role of the autophagy machinery in the synaptic pruning. Autophagy is a cellular mechanism that removes residual or dysfunctional components and its main regulator is mTOR (mammalian target of rapamycin). In the central nervous system, autophagy is critical for maintaining several neuronal functions, and dysfunction of this pathway take part in several inflammatory and neurodegenerative diseases. Thus, modulators of mTOR, such as rapamycin, have been used as treatment by reducing the inflammation and ameliorating the progression of the disease. Alcohol is a neurotoxic compound and it has been demonstrated that its abuse in adolescence induces neuroinflammation, synaptic and myelin alterations, neural damage and changes in memory and learning. Indeed, autophagy takes place in different brain regions (e.g., prefrontal cortex, hippocampus), where it participates during brain remodeling until adulthood (Pascual et al., 2019). Studies from the Cell Pathology laboratory of CIPF have been pioneered in proving evidence that alcohol abuse in the form of binge drinking in adolescence alters the autophagy mechanisms associated with changes in the levels of excitatory scaffolding synaptic proteins, PSD-95 and SHANK3 (Montesinos et al., 2018). Taking into consideration the involvement of the autophagy pathway in the synaptic plasticity as well as the role of the transcriptional factor CREB (cAMP-responsive element-binding protein) in mechanisms involved in cognitive processes, the hypothesis of this study is to evaluate whether binge alcohol drinking in adolescence is able to alter the CREB pathway and if these effects are mediated by mTOR. **Methodology:** We use female and male adolescent mice treated with or without alcohol in presence or absence of the mTOR inhibitor, rapamycin, administered previously to the alcohol dose. The ethanol (3 g/kg) is given intraperitoneally to 30-day-old mice on 2 consecutive days with 2-day gaps during 14 days. The expression of p-CREB, p-ERK and p-Akt was evaluated in these animals in hippocampus and prefrontal cortex by western-blot. **Results** show that ethanol treatment decreases the levels of CREB and ERK phosphorylation in hippocampus and prefrontal cortex of female and male adolescent mice, whereas no changes were observed in Akt. Moreover, the administration of rapamycin was able to restore these changes induced by the use of alcohol in adolescence. Therefore, our results suggest that the mTOR-regulated autophagy could participate in the alterations induced by the alcohol abuse in adolescence in the CREB signaling pathway, which could lead to synaptic plasticity dysfunctions and memory and learning impairments.

Keywords: Adolescence, binge alcohol treatment, autophagy, mTOR, synaptic plasticity, CREB.

Agradecimientos

Parece que fue ayer cuando escuche por primera vez lo que era la ciencia y ya le he dedicado más tiempo que cualquier otra cosa en mi vida. Con este trabajo cierro otra etapa más de las muchas que ya he completado y de las que me quedan por descubrir, tanto a nivel personal como profesional. Nunca he tenido claro si este era el camino correcto pero siempre he intentado que haya merecido la pena, así que espero no rendirme nunca aunque encuentre piedras en el camino.

Lo primero de todo, me gustaría agradecer a mi familia las innumerables horas que me han tenido que aguantar y apoyar con cada pequeña situación tanto buena como mala y por corregirme cuando me he equivocado. Espero que lo sigáis haciendo durante muchos años más.

También a mis amigos, tanto de fuera de la carrera como de dentro, los cuales conocí hace solo cuatro años y ya hemos podido compartir experiencias que nunca olvidaré (los trabajos hechos en la carrera seguramente sí). Recordaré los viajes por toda Europa, el Erasmus, las noches sin dormir y las partidas a mil juegos diferentes.

Y para acabar, darle las gracias a Consuelo Guerri por dejarme entrar en su laboratorio después de haber tenido muchos problemas previos, a María Pascual por guiarme durante el TFG y a todo el I-05, porque, aunque haya sido corta la estancia, he podido ver de primera mano como funciona el mundo de la investigación y lo que puede que me espere en un futuro muy próximo.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Adolescencia.....	1
1.2 El alcohol.....	2
1.2.1 Efectos del alcohol en el organismo.....	3
1.2.2 Efectos del alcohol en el cerebro adolescente.....	4
1.3 Autofagia.....	4
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Animales de experimentación.....	10
3.2 Tratamiento de alcohol.....	10
3.3 Obtención de muestras.....	10
3.4 Disección y congelación.....	12
3.5 Lisado celular.....	12
3.6 Cuantificación de la concentración de proteína.....	12
3.7 Western Blot.....	13
3.7.1 Electroforesis e inmunotransferencia.....	13
3.7.2 Revelado.....	15
3.7.3 Análisis estadístico.....	15
4. Resultados.....	16
4.1 Función de la ruta CREB en el bloqueo de la autofagia, producido por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes.....	16
4.2 Función del papel de ERK en la activación de CREB por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes e implicación de la autofagia en estos efectos.....	18
4.3 Función del papel de Akt en la activación de CREB inducida por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes e implicación de la autofagia en estos efectos.....	20
5. Discusión.....	21
6. Conclusiones.....	23
7. Bibliografía.....	24

Índice de tablas y figuras

Figura 1. Densidad de la materia gris (naranja) y materia blanca (azul) en las edades 5, 8, 12, 16 y 20-21 años.....	1
Figura 2. Proceso de autofagia desde la formación de la membrana de aislamiento hasta la degradación final en el autolisosoma.....	5
Figura 3. Esquema del proceso de señalización del receptor TLR4 a través del etanol... 7	7
Figura 4. Esquema que relaciona la quinasa mTOR con la activación del factor de transcripción CREB.....	8
Figura 5. Representación esquemática del diseño experimental.....	11
Figura 6. Expresión de la fosforilación del factor de transcripción CREB.....	17
Figura 7. Expresión de la fosforilación de la proteína quinasa ERK.....	19
Figura 8. Expresión de la fosforilación de la proteína quinasa Akt.....	20
Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en la incubación de los Western Blot.....	14
Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en la incubación de los Western Blot.....	14

Índice de abreviaturas

WHO :	World Health Organization
ROS :	Reactive oxygen species
OCM :	One-carbon metabolism
MS :	Methionine synthase
TLRs :	Toll-like receptors
NLRs :	NOD-like receptors
mTOR :	mammalian target of rapamycin
CIPF :	Centro de Investigación Príncipe Felipe
PSD-65 :	Postsynaptic density 65
SHANK3 :	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
MyD88 :	Myeloid differentiation primary response gene 88
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
ERK :	Extracellular signal-regulated kinase
PI3K :	Phosphoinositide 3-kinase
Akt :	Protein kinase B
CREB :	cAMP-responsive element-binding protein
DPN :	Día postnatal

1. Introducción

1.1 Adolescencia

La maduración del cerebro ha sido clásicamente analizada de forma transversal, no obteniendo un enfoque real de su desarrollo durante la adolescencia. Sin embargo, estudios de las últimas décadas realizados por resonancia magnética, muestran en detalle los estadios espaciotemporales del desarrollo de cerebro, incluyendo la adolescencia (Gogtay et al., 2004). En el proceso de desarrollo, se ha observado una correlación entre la reducción de la densidad de la materia gris (MG) y el crecimiento cerebral, principalmente localizada en la corteza frontal y la dorsoparietal (Sowell et al., 1999).

Diversas razones han sido dadas para explicar la pérdida de MG y el aumento de materia blanca (MB) durante la transición de la niñez (5 años) al cerebro adulto (20-21 años), pasando por un periodo de transición, que es la adolescencia (12-18 años). Estudios experimentales en humanos y en animales demuestran que durante la adolescencia tiene lugar una poda sináptica (materia gris) en ciertas partes del cerebro (como la corteza prefrontal y el hipocampo), mientras que los axones que establecen sus conexiones se recubren de mielina (materia blanca), lo que se denomina mielinización axonal (Bartzokis et al., 2001), que permite aumentar la transmisión sináptica (Fig. 1).

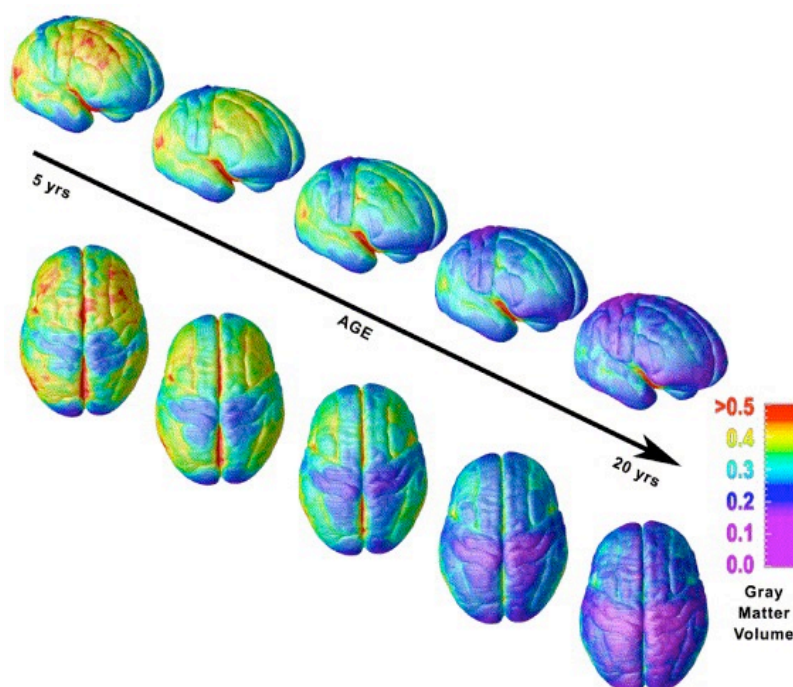


Figura 1. Densidad de la materia gris (naranja) y materia blanca (azul) en las edades 5, 8, 12, 16 y 20-21 años (Imagen tomada de Toga et al., 2006).

Análisis post-mortem de los pasos de maduración cerebral han mostrado que la maduración es heterogénea, ocurriendo en diferentes etapas en áreas diferentes del cerebro. Conforme a estas diferencias, el ratio de procesos regresivos, como la poda sináptica, y progresivos, como la mielinización, ocurren al mismo ritmo que la maduración en cada área cerebral, sugiriendo una conexión entre ellos.

Este desarrollo heterogéneo puede afectar negativamente a la adolescencia, ya que una de las primeras regiones cerebrales en desarrollarse es la límbica (formada por el hipocampo y el tálamo entre otros), la cual controla la estimulación, la memoria y las emociones, y la última es la corteza prefrontal, la cual controla diferentes funciones como el razonamiento y el pensamiento. Un efecto de esta situación es que los niños jóvenes asumen más riesgos y buscan la aceptación, cayendo en presiones de grupo y consumiendo drogas, incluyendo el alcohol.

Gran variedad de conductas de consumo de alcohol se han observado que se desarrollan durante la adolescencia y continúan hasta el final de ésta e incluso la edad adulta (Chartier et al., 2010), produciendo efectos dañinos durante la maduración cerebral, causando desequilibrios cognitivos y de comportamiento. Entre ellos se encuentra el consumo de alcohol en atracón o "*binge drinking*", considerado como el consumo de 4 bebidas alcohólicas para las mujeres y cinco para los hombres, en un periodo máximo de 2 horas, suponiendo de esta manera un aumento de alcohol en sangre hasta valores de 0,08 g/dL (según datos proporcionados por el NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM, s.f.).

1.2 El alcohol

El consumo y abuso de alcohol es uno de los mayores problemas que sufre actualmente la población mundial. Por esta razón, causa un gran impacto en la salud y en la vida tanto de jóvenes como de mayores produciendo enfermedades y patologías sociales que pueden afectar de manera irreversible.

Cerca del 45% de la población mundial mayor de 15 años consume alcohol de forma regular, siendo este porcentaje de alrededor del 55% en regiones como Europa, América y la Región del Pacífico Occidental (WHO, 2018). Esto indica que esta sustancia está ampliamente aceptada por la sociedad incluso sabiéndose todos los problemas tanto físicos como mentales que ocasiona.

En la proporción joven de la sociedad, el 59,8 % de la población europea comprendida entre 15 y 19 años bebe o ha bebido recurrentemente alcohol y el 58,4 % de los comprendidos entre 20 y 24 años lo consume habitualmente, mostrando que estos hábitos no comienzan una vez obtenida la mayoría de edad, sino que desde edades

tempranas, por un amplio abanico de motivos, el alcohol se incluye en la vida de estas personas condicionando su salud para siempre.

Consecuencia directa de esto son los datos recogidos mostrando que alrededor del 17% de todas las muertes globales y también en adolescentes en Europa ocurrieron por causa del alcohol, mostrando que es un problema al cuál hay que prestar atención y resolver en la medida de lo posible (WHO, 2018).

1.2.1 Efectos del alcohol en el organismo

El desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre los que se encuentran aquellos relacionados con el tracto gastrointestinal (Ma et al., 2017), puede, de la misma forma, verse favorecido por una ingesta de alcohol constante. Esto se debe, en primera instancia, a que algunos de los productos del metabolismo del alcohol, como el acetaldehído y las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Mizumoto et al., 2017), si no son detoxificados de forma eficiente, producen daños en el ADN, facilitando el desarrollo de cánceres.

Por otro lado, la *one-carbon metabolism* (OCM) es una de las rutas esenciales para la metilación y la reparación del daño en el ADN, y el alcohol inhibe una de las enzimas esenciales de la misma, la metionina sintasa (MS) (Barak et al., 1985), produciendo un efecto conjunto.

El alcohol también es un factor de riesgo para diferentes enfermedades infecciosas. Un claro ejemplo es la tuberculosis, la cual presenta un alto ratio de mortalidad y afecta principalmente a países en vías de desarrollo (WHO, 2017c). En cuanto a enfermedades cardiovasculares, también se ha observado un patrón en el incremento de incidencia de éstas y el consumo de alcohol (O'Keefe et al., 2014).

El efecto del alcohol también produce daño hepático, siendo uno de sus principales causantes, produciendo diversas patologías como la hepatitis alcohólica pudiendo derivar en cirrosis. La principal razón de este efecto es que el metabolismo del etanol tiene lugar en el hígado, causando hígado graso y cirrosis (Cederbaum, 2012).

La diabetes mellitus, otra de las enfermedades sufridas por gran parte de la población mundial, también puede ser favorecida por el consumo de alcohol, ya que, en exceso, produce alteraciones en la homeostasis de la glucosa y puede llevar a desarrollar resistencia a la insulina (Wan et al., 2005). Sin embargo, algunos estudios sugieren que un consumo bajo o moderado de alcohol mejora la sensibilidad a la insulina reduciendo el riesgo de padecer diabetes tipo 2.

De la misma forma, el uso de alcohol por parte de mujeres embarazadas produce problemas como abortos espontáneos, nacimientos prematuros y bajo peso al nacer (Henriksen et al., 2004). También se ha determinado que provoca mayor retardo en el

reconocimiento del embarazo, exponiendo al feto a esta sustancia y ocasionando problemas en su etapa de desarrollo postnatal, conocidos como *fetal alcohol spectrum disorders* (FASD) (Tsang et al., 2016).

1.2.2 Efectos del alcohol en el cerebro adolescente

El consumo de alcohol de forma constante se ha demostrado que reduce el volumen del cerebro en adolescentes, principalmente en la corteza prefrontal, pero también en zonas como el cerebelo y el hipocampo (De Bellis et al., 2000). La neurodegeneración ocurre debido a la activación de las células inmunes microglía y astrocitos, por parte de los receptores inmunes *Toll-like receptors* (TLRs) y *NOD-like receptors* (NLRs) activados también por el alcohol. Esto provoca la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, quimiocinas y ROS (Fernandez-Lizarbe et al., 2009) que dan lugar a neuroinflamación constante, provocando daño cerebral. De la misma forma, deformidades estructurales causadas por la pérdida de fibras derivada de la destrucción de rutas metabólicas de la MB por parte del alcohol, también han sido halladas (McQueeney et al., 2009). Esto, entre otras consecuencias, propicia que mediante tests neuropsicológicos se observe que aquellos adolescentes con mayor consumo medio de alcohol desarrollen fallos en la memoria declarativa verbal y visual. Otras alteraciones halladas son errores a la hora de la percepción visoespacial y en el mantenimiento de la atención en una tarea concreta (Squeglia et al., 2009), así como peor rendimiento académico.

De forma contraria, estudios sugieren que no siempre se producen daños en el organismo, sino que dependiendo de la dosis se pueden empezar a mostrar alteraciones significativas o no, siendo estas muy relevantes alrededor de 10 dosis en una sola ocasión (Pascual et al., 2018), aunque la predisposición genética puede hacer variar estos resultados.

1.3 Autofagia

La autofagia es un mecanismo celular que elimina material residual o componentes no funcionales y está implicado en la plasticidad y desarrollo sináptico.

Existen diversos tipos, siendo el más estudiado la macroautofagia (Lee, 2012). El proceso catabólico comienza secuestrando componentes citoplasmáticos inservibles en vesículas de doble membrana llamadas autofagosomas (Fig. 2), que posteriormente se liberan en el interior de un lisosoma o de una vacuola, dependiendo de si el organismo es una célula animal o una levadura respectivamente, para ser seguidamente degradados. Se ha demostrado la implicación de la autofagia en procesos de respuesta inmune, proliferación, homeostasis, diferenciación, cáncer y apoptosis y, por último, en los de maduración sináptica (Shehata e Inokuchi, 2014).

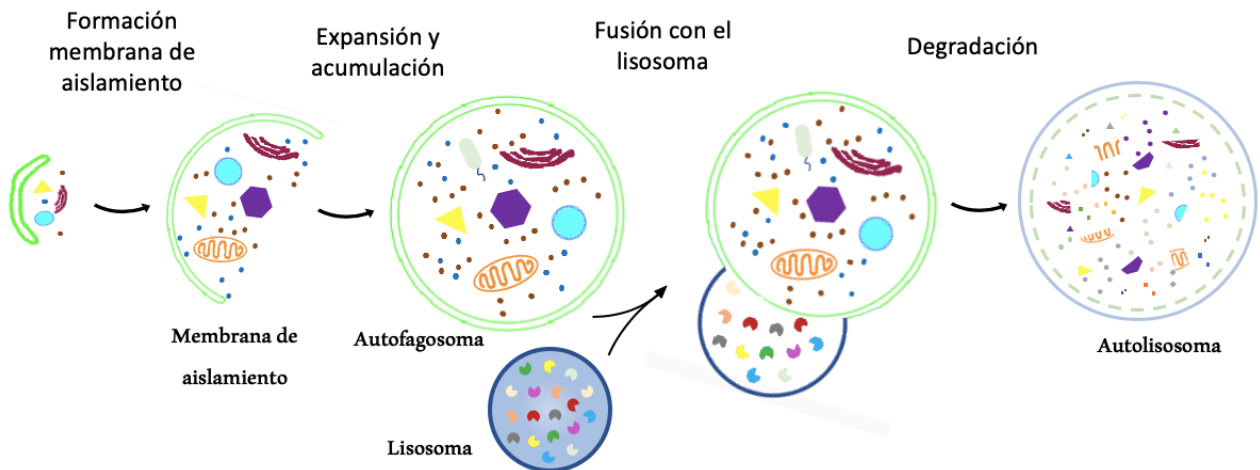


Figura 2. Proceso de autofagia desde la formación de la membrana de aislamiento hasta la degradación final en el autolisosoma.

La autofagia tiene una gran importancia en la supervivencia del sistema nervioso ya que su efecto en las neuronas es crítico. Este tipo celular tiene componentes muy especializados en los cuales una gran cantidad de productos son tanto creados como consumidos y necesitan un sistema efectivo para poder limpiar su ambiente celular de elementos innecesarios. También se debe tener en cuenta que las neuronas no se dividen, siendo de esta manera más susceptibles que otros tipos celulares a acumulaciones de desechos tóxicos, teniendo que regular de una forma muy estricta todo elemento presente en su citoplasma en condiciones fisiológicas aceptables.

De este modo, cualquier alteración que produzca un desequilibrio del proceso autofágico en el cerebro adolescente puede causar alteraciones en la maduración sináptica y conllevar a alteraciones cognitivas y conductuales a largo plazo (Montesinos et al., 2015, 2016). En el cerebro adulto, alteraciones en la autofagia por el alcohol o por otros procesos patológicos se asocian con una acumulación de autofagosomas y procesos neurodegenerativos que pueden llegar a ocasionar enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o la enfermedad de Huntington.

Finalmente, el cerebro es un órgano que necesita un importante aporte energético y, por tanto, está estrictamente regulado de forma muy precisa y debe de poder recibir nutrientes suficientes bajo cualquier situación (Boland y Nixon, 2006). Por tanto, la regulación por parte de la autofagia debe ser completa y alteraciones en este proceso durante el desarrollo del cerebro, como la adolescencia, pueden conducir a defectos tanto estructurales como en la maduración sináptica y conllevar a efectos a largo plazo en el individuo adulto.

Introducción

El principal regulador de la autofagia es mTOR (*mammalian target of rapamycin*), una quinasa (*serine/threonine protein kinase*). Estudios previos del laboratorio de Patología Celular del CIPF (Montesinos et al., 2018), han demostrado que el consumo de alcohol en forma de atracción activa la respuesta inmune innata del receptor TLR4 que induce, a su vez, un aumento en la fosforilación de mTOR y de la fosforilación de ULK1 (*Unc-51-like kinase-1*) en la posición Ser757. El proceso es complejo ya que ULK tiene dos reguladores, el primero es mTOR, y mediante la fosforilación en esta posición inhibe la autofagia, mientras que existe otro regulador que la promueve, siendo este la AMPK, (*AMP activated protein kinase*) que fosforila en la posición Ser555. Esta inhibición por parte de mTOR ocurre ya que el complejo Atg1/ULK1 participa en el inicio de la formación de la membrana de aislamiento y en el ensanchamiento de ésta junto a los complejos Atg5-Atg12-Atg16 y Atg8/LC3-phosphatidylethanolamine por un lado, y SQSTM1/p62 por otro. Debido a que este segundo complejo interactúa con LC3-II para la creación del autofagosoma y continuación de la autofagia, su bloqueo provoca la acumulación de estos compuestos (Fig. 2).

En este mismo estudio se observó que el alcohol aumenta la actividad en mTOR, y este efecto se asociaba con alteraciones en la pérdida de las espinas dendríticas, un proceso clave en la maduración sináptica adolescente. La pérdida de dichas espinas se evaluó mediante cambios en ciertas proteínas sinápticas estructurales excitatorias (PSD-95 y SHANK3) durante el periodo de maduración en la adolescencia. Los resultados demuestran que, mientras en cerebro de animales controles se produce una reducción progresiva de las espinas dendríticas y de la expresión de las proteínas PSD-95 y SHANK3 durante la adolescencia, la exposición al etanol durante esta periodo no afecta la expresión de estas proteínas sinápticas estructurales excitatorias, sugiriendo alteraciones en la plasticidad sináptica (Montesinos et al., 2018). Además, en este trabajo, se demuestra que, tanto el mTOR como los receptores del sistema inmune TLR4, participan en las alteraciones de la autofagia causadas por el etanol, puesto que tanto la inhibición de mTOR con rapamicina como la eliminación o bloqueo de los TLR4 previenen las alteraciones que causa el alcohol en la plasticidad cerebral (Montesinos et al., 2018). Estos resultados sugieren que, tanto la eliminación del TLR4 como la inhibición de mTOR mediante rapamicina, facilitan la plasticidad sináptica.

Introducción

Como se observa en la figura 3, los receptores TLR4 se encuentran en las balsas lipídicas y son activados por el etanol, reclutado con ayuda de las proteínas adaptadoras CD14 y MD-2. Esto provoca la incorporación del complejo MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) y la consiguiente activación de las rutas de señalización MAPKs (*mitogen-activated protein kinase*)/ERK y PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*)/Akt que activarán mTOR produciendo el bloqueo de la autofagia mediante el proceso previamente explicado.

Por otro lado (Fig. 4), mTOR puede activar las MAPKs/ERK y PI3K/Akt involucrando al factor de transcripción CREB (cAMP-responsive element-binding protein) (Liu et al., 2013), el cuál participa en diversos procesos cognitivos y se encuentra en el núcleo celular. Una vez activo, gracias a diversos estudios, se ha demostrado que tiene influencia en algunos desarrollos celulares como la plasticidad sináptica a largo plazo o la formación de la memoria (Alberini, 2009; Sakamoto et al., 2011).

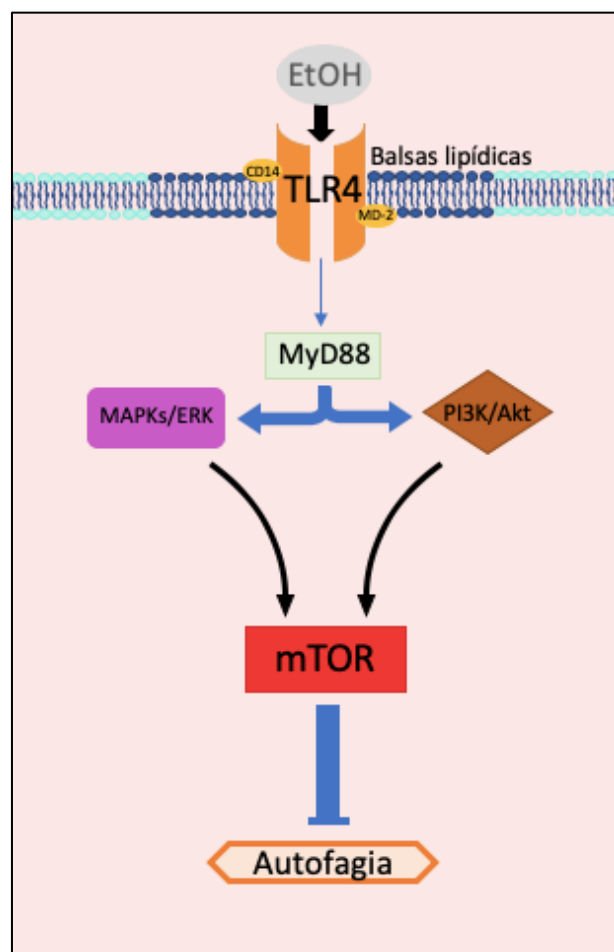


Figura 3. Esquema del proceso de señalización del receptor TLR4 a través del etanol.

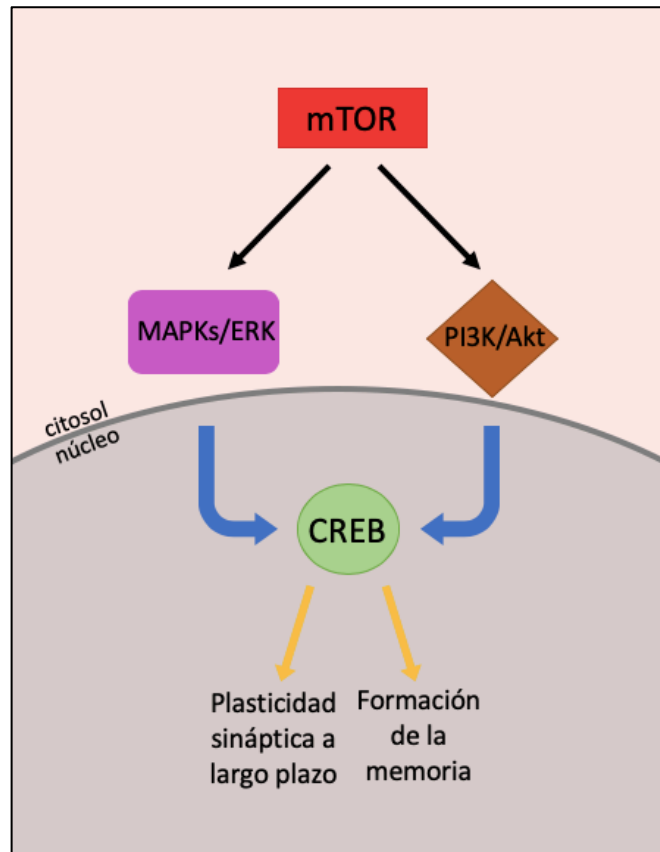


Figura 4. Esquema que relaciona la quinasa mTOR con la activación del factor de transcripción CREB.

2. Objetivos

Durante la adolescencia diferentes cambios dinámicos y plásticos ocurren en el cerebro adolescente para que de esta forma se complete su maduración y, por tanto, poder desarrollar funciones más complejas. Además, estos eventos pueden ser alterados por la presencia de altos niveles de alcohol a nivel cerebral. Basado en estudios previos, incluyendo resultados realizados por el laboratorio de Patología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Montesinos et al., 2018), en este trabajo se pretende determinar el papel de la autofagia durante el desarrollo del cerebro durante la adolescencia e investigar los efectos del alcohol en el cerebro adolescente.

El consumo de alcohol en forma de atracón durante la adolescencia, se ha podido observar que modifica la fosforilación de la principal proteína reguladora de la autofagia, mTOR, que conlleva a la alteración de los niveles de expresión de las proteínas sinápticas estructurales excitatorias PSD-95 y SHANK3, pudiendo verse alterada la función cognitiva en el cerebro adolescente tras el consumo de alcohol.

Puesto que se ha demostrado la participación del factor de transcripción CREB en los procesos cognitivos, y la participación de la autofagia en la regulación de CREB (Seok et al., 2014), la hipótesis del presente estudio consiste en **demostrar si el abuso de etanol durante la adolescencia es capaz de alterar la vía de señalización de CREB y si estos cambios podrían estar mediados a través de la proteína reguladora de la autofagia mTOR.**

Los objetivos para llevar a cabo esta hipótesis son:

- Demostrar si el alcohol en forma de atracón durante la adolescencia es capaz de alterar la fosforilación del factor de transcripción CREB en diferentes zonas del cerebro, como el hipocampo y la corteza prefrontal.
- Demostrar la implicación de la autofagia en los efectos del alcohol sobre la fosforilación de CREB utilizando el inhibidor de mTOR, la rapamicina.
- Evaluar si las proteínas ERK y Akt estarían regulando la fosforilación de CREB a través de los efectos del alcohol y la implicación de la autofagia en estos procesos.

3. Materiales y métodos

3.1 Animales de experimentación

Los animales de experimentación que formaron parte del experimento fueron machos y hembras C57BL/6 WT (*wild-type*) (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Los animales fueron organizados en 4 de ellos por caja y fueron provistos con agua y dieta sólida *ad libitum*.

El experimento se realizó con ambos machos y hembras para así observar si diferencias relacionadas con el sexo podrían ocurrir, debido a que estudios previos de nuestro laboratorio mostraron una mayor susceptibilidad a la inflamación por parte del grupo femenino adolescente causada por el tratamiento con alcohol (Pascual et al., 2017). Esto significaría que el sistema inmune se comporta diferente dependiendo del sexo del animal.

Las condiciones ambientales fueron estrictamente monitorizadas y establecidas en luz y oscuridad 12/12 h, 23 °C de temperatura y una humedad del 60%. Los procedimientos experimentales animales fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España), siguiendo las directrices aprobadas por la Directiva del Consejo de las Comunidades Europeas (86/609/ECC) y el Decreto Real Español 1201/2005. Los experimentos animales también fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia, España).

3.2 Tratamiento de alcohol

Los ratones siguieron un tratamiento intermitente de etanol (Fig. 5) y fueron administrados dosis matutinas (9-10 a.m.) de solución salina o de 25% (v/v) etanol (3 g/kg) en solución isotónica. Estas dosis fueron aplicadas intraperitonealmente a ratones de 30 días de edad en secuencias de dos días consecutivos aplicándola y dos días de descanso durante un periodo de 2 semanas (del día postnatal 30 al 43) (Pascual et al., 2007).

Para poder inhibir la ruta mTOR, también se inyectó rapamicina intraperitonealmente (3 mg/kg; LC Laboratorios, Woburn, Canadá) disuelta en 100% DMSO, y diluida a 60% (v/v) con solución fisiológica salina, 1 hora previa a cada inyección de etanol.

3.3 Obtención de muestras

Los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ 24 horas después de la última administración de etanol o de la solución salina, en DPN44 (Día postnatal 44). No se detectaron niveles de etanol en el suero pasadas 24 horas de la última dosis de etanol.

Los tres grupos que conforman el estudio fueron:

- Ratones tratados con solución salina (control)
- Ratones tratados con etanol
- Ratones tratados con etanol y rapamicina

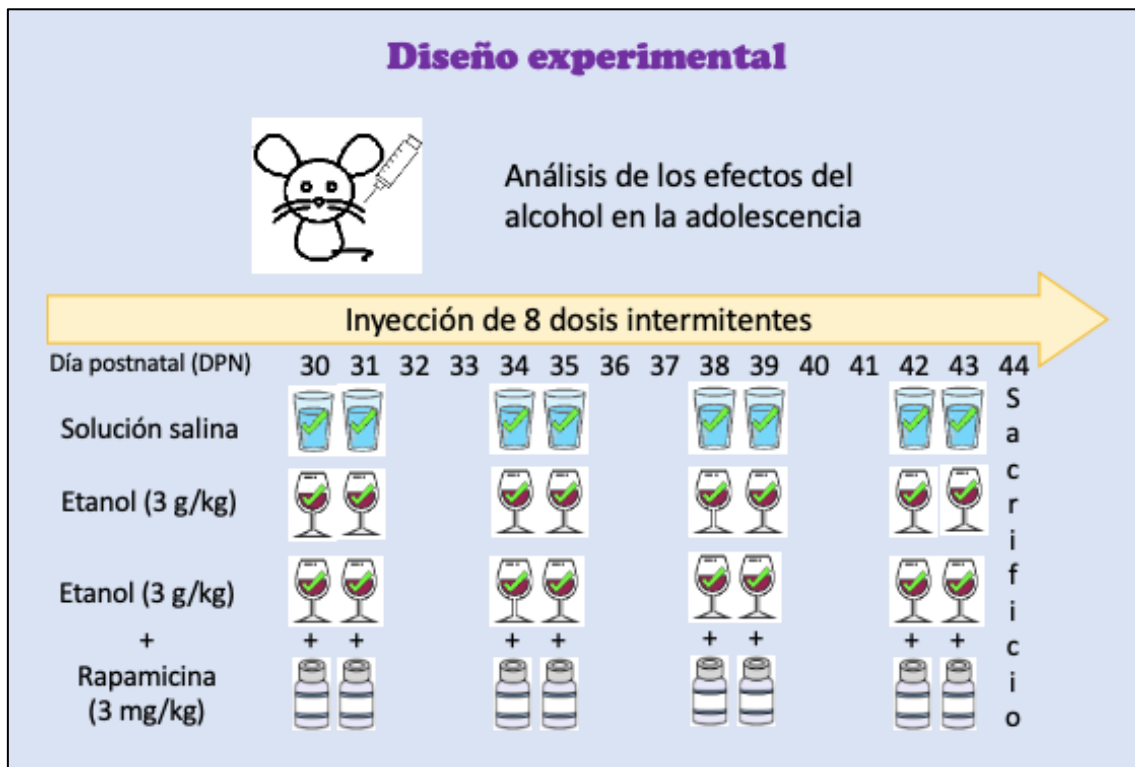


Figura 5. Representación esquemática del diseño experimental. Se utilizaron ratones machos y hembras DPN30 C57BL/6 WT (Harlan Ibérica, Barcelona, España) a los cuales se les inyectaron intraperitonealmente dosis matutinas de solución salina, de 25% (v/v) etanol (3 g/kg) en solución isotónica o dicha dosis de etanol 1 hora posterior a la inyección de rapamicina (3 mg/kg) disuelta en 100% DMSO (dimetilsulfóxido), y diluida a 60% (v/v) con solución fisiológica salina. Las dosis fueron administradas en periodos de dos días consecutivos dejando dos días de reposo durante un espacio de dos semanas, siendo en total 8 dosis y finalizando en DPN43 (Día postnatal 43). Finalmente, los ratones fueron sacrificados en DPN44 para su posterior análisis.

3.4 Disección y congelación

Los animales fueron recogidos y se les retiró el cerebro. Se procedió a la disección de la corteza prefrontal y del hipocampo e inmediatamente fueron lavados y criopreservados introduciendo las muestras en nitrógeno líquido y posteriormente a -80°C para su consiguiente análisis.

3.5 Lisado celular

Una pequeña porción de tejido cerebral de hipocampo y de corteza prefrontal fue utilizado para realizar el lisado celular. Al tejido cerebral se le añadieron 200 µl de tampón de lisis y se homogenizó en un dispersor (ULTRA-TURRAX T8, IKA).

El tampón de lisis previamente preparado contenía Tris-HCl 20 mM pH 8, Nonidet P-40 al 1% (v/v), cloruro sódico 4 mM, fluoruro sódico 40 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 40 µM, DTT 1mM, Na₃VO₄ 1mM y PMSF 1 mM, para de ese modo liberar el contenido celular. Las muestras se incubaron a 4°C durante 30 minutos, agitando con vórtex la disolución en periodos de 10 minutos para poder obtener un lisado homogéneo completo.

Este paso finalizó con una centrifugación a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos de forma que el precipitado con los restos celulares se separó del contenido proteico presente en el sobrenadante, y este sobrenadante se recogió en tubos nuevos.

3.6 Cuantificación de la concentración de proteína

Una vez realizado el lisado celular, se hizo uso del kit BCA Protein Assay Kit (Pierce, ThermoFisher) para de ese modo poder cuantificar la concentración de proteína total que contenían las muestras.

Durante la primera etapa ocurre la reducción de Cu²⁺ a Cu¹⁺ mediante la proteína en un medio alcalino, conocida como la reacción de Biuret, produciendo un complejo azul. Posteriormente, en la segunda fase del proceso, el ácido bicinchonínico (BCA), reacciona con el Cu¹⁺ generado previamente obteniendo un producto final de color morado. Se realizó el procedimiento y finalmente se midió a 562 nm, el valor al cual absorbe el producto para obtener la cantidad de proteína presente.

Tanto la medida de las absorbancias de cada muestra como la reacción colorimétrica se realizó en el mismo espectrofotómetro (Wallac Victor2 1420 Multilabel HTS counter, Perkin Elmer).

3.7 Western blot

3.7.1 Electroforesis e inmunotransferencia

Se cuantificó la proteína para poder determinar de forma correcta el resultado del Western Blot. De esa forma al observar mayor expresión en los pocillos es únicamente por mayor expresión de la proteína y no por tener una mayor concentración.

Para proceder con la electroforesis de las muestras de hipocampo y corteza prefrontal de machos y hembras, se prepararon geles de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS) al 12% para observar las proteínas, ya que estas presentan un peso molecular bajo.

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6x y se pusieron a hervir durante 5 minutos a 100°C en un termobloque (SBH200D, Stuart) para desnaturalizarlas. Posteriormente se cargó en cada una de las calles del gel los microlitros de muestra correspondientes a una cantidad de proteína de 30 µg y se dejó correr el gel 15 minutos a 80 V seguidos de 90 minutos a 100-120 V.

A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas de los geles de poliacrilamida a membranas de polivinilideno utilizando un tampón de transferencia (Tampón Tris-Glicina 1x, Metanol 20%) usando un voltaje de 100 V durante 1 hora.

Una vez realizada la transferencia, se dejan incubar las membranas 1 hora en solución de bloqueo compuesta por BSA al 5% (ThermoFisher Scientific) en tampón de lavado TBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) con Tween 20 0,1% (TBST), de forma que se impiden las uniones inespecíficas al añadir posteriormente el anticuerpo primario. A continuación se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios (Tabla 1) durante la noche para obtener uniones específicas de calidad. Posteriormente, se lavaron tres veces las membranas con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 2).

En algunas membranas, posteriormente, se realizó una eliminación de los anticuerpos denominada "stripping" para poder ser de nuevo incubadas dichas membranas con otros anticuerpos primarios y secundarios. Para realizarlo se añadió en una cubeta 15,2 ml de H₂O, 4 ml de glicina y 0,8 ml de SDS al 10% y se dejó 30 minutos realizando posteriormente dos lavados de 5 minutos con TBST.

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en la incubación de los Western Blot.

<i>Anticuerpo anti-</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución</i>	<i>Huésped</i>	<i>Referencia</i>
CREB	Cell signaling, USA	1:1000	Conejo	9192
p-CREB	Cell signaling, USA	1:1000	Conejo	9191S
ERK	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000	Ratón	sc-271269
p-ERK	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000	Ratón	sc-7383
Akt	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000	Conejo	sc-8312
p-Akt	Santa Cruz Biotechnology, USA	1:1000	Conejo	sc-101629

Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en la incubación de los Western Blot.

<i>Anticuerpo anti-</i>	<i>Casa comercial</i>	<i>Dilución</i>	<i>Huésped</i>	<i>Referencia</i>
Anti-rabbit IgG HRP	Sigma-Aldrich	1:20.000	Cabra	A9169
Anti-mouse IgG HRP	Sigma-Aldrich	1:5000	Ratón	A9044

3.7.2 Revelado

Las proteínas se revelaron mediante el sistema ECL Plus (Thermo Fisher Scientific, Illinois, USA). Se aplicó el kit sobre la membrana de polivinilideno en la cual estaban incubados los anticuerpos secundarios y se dejó actuar para que ocurriera la reacción.

La intensidad de banda se cuantificó con el software de análisis ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). El análisis de densimetría se muestra en unidades arbitrarias normalizadas al control de carga respectivo.

3.7.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los Western Blot presentes en este estudio, fue realizado usando el programa GraphPad Prism v5.01 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Los datos están representados como la media \pm SEM (Standard error of the mean) o Error estándar de la media. La significancia estadística fue determinada mediante One-way ANOVA, seguida por el test post-hoc de Newman-Keuls. Para analizar diferencias de sexo se llevó a cabo un Two-way ANOVA (variables tratamiento y sexo).

4. Resultados

Para poder dilucidar si CREB tiene alguna influencia en los procesos sinápticos causados por el alcohol y la posible implicación del mecanismo de la autofagia en estos procesos, se establecieron diferentes condiciones bajo las cuales se observarían los niveles de CREB fosforilada tanto en hipocampo como en la corteza prefrontal de animales adolescentes macho y hembra. Los experimentos se llevaron a cabo en los siguientes grupos experimentales: grupo de animales tratados con solución salina, con alcohol y con alcohol mediante previa administración de rapamicina.

También se analizaron los niveles de fosforilación de ERK y Akt con el objeto de determinar si estas quinasas tienen alguna influencia en la fosforilación de CREB.

4.1. Función de la ruta CREB en el bloqueo de la autofagia, producido por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes.

En la figura 6 se demuestra que la administración de alcohol reduce la fosforilación de CREB. Así, observamos como en las muestras de hipocampo de animales adolescentes con exposición al alcohol se produce una disminución estadísticamente muy significativa de la fosforilación del factor de transcripción CREB en hembras tratadas con etanol con respecto al grupo tratado con salino. Sin embargo, este efecto se redujo en el grupo de machos, ya que aunque la diferencia es significativa, ésta es menor que en el grupo de las hembras, cuando los resultados se comparan con sus respectivos controles. Del mismo modo, a la hora de comparar el grupo tratado con rapamicina más etanol en hembras también observamos diferencias significativas con respecto al grupo etanol, pero estas diferencias son ligeramente menores que en machos. Si analizamos las diferencias entre los grupos de salino y tratamiento con rapamicina más etanol, tanto en machos como en hembras obtenemos que no existen diferencias significativas entre ellos. Para estudiar posibles diferencias de sexo en la fosforilación de CREB, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante Two-way ANOVA, obteniendo que no existen diferencias de sexo en hipocampo.

Atendiendo a los resultados de las muestras de corteza prefrontal en la misma figura 6, podemos observar que no existen diferencias significativas entre ninguno de los grupos del estudio dentro de cada sexo, ni comparando los mismo grupos entre los dos diferentes sexos.

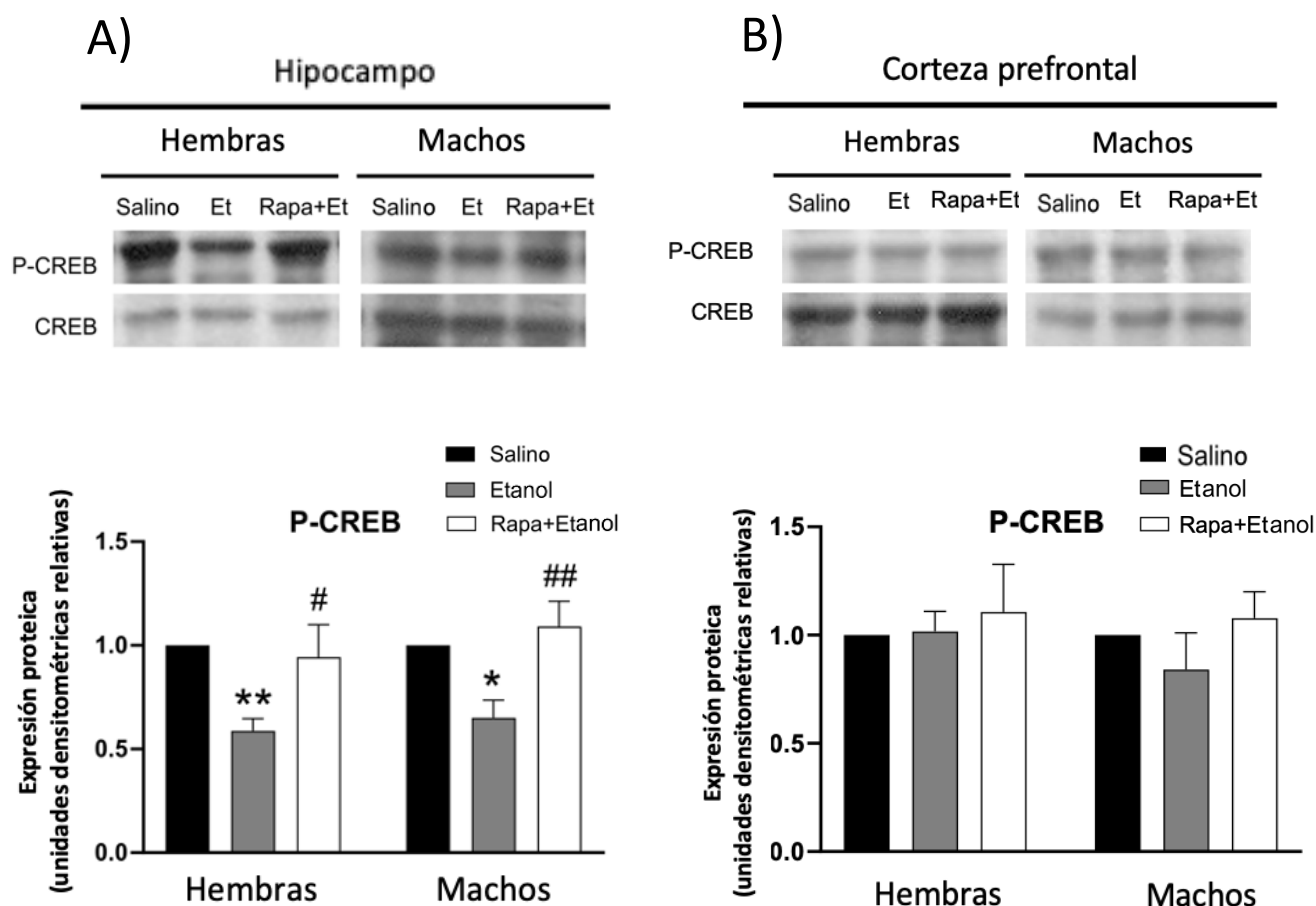


Figura 6. Expresión de la fosforilación del factor de transcripción CREB. (A) Western Blot y cuantificación del factor de transcripción CREB (*cAMP-responsive element-binding protein*) en su forma fosforilada y sin fosforilar de hipocampo de ratones hembras y machos DPN44 (Día postnatal 44) sometidos a tratamientos con solución salina, etanol y rapamicina más etanol, administrada 1 hora previa al alcohol. **(B)** Western Blot y cuantificación del factor de transcripción CREB en su forma fosforilada y sin fosforilar de corteza prefrontal de ratones hembras y machos DPN44 sometidos a tratamientos con solución salina, etanol y rapamicina más etanol, administrada 1 hora previa al alcohol. Los datos están representados como media \pm SEM (Error estándar de la media), $n = 6$, * $p < 0,05$ comparado con el grupo de salino, ** $p < 0,01$ comparado con el grupo de salino, # $p < 0,05$ comparado con el grupo de etanol, ## $p < 0,01$ comparado con el grupo de etanol.

4.2. Función del papel de ERK en la activación de CREB por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes e implicación de la autofagia en estos efectos.

Posteriormente, analizamos la fosforilación de ciertas quinasas importantes en la vía que conlleva a la fosforilación de CREB, como la ERK. Los resultados obtenidos del estudio de la fosforilación de ERK (Fig. 7) en hipocampo, demuestran que el tratamiento de etanol reduce significativamente la fosforilación de ERK tanto en hembras como en machos cuando se compara con sus grupos control o tratados con solución salina.

La figura 7 también muestra que, la inhibición de mTOR mediante la administración de rapamicina previamente al tratamiento de etanol, causa en hipocampo notables diferencias significativas al comparar con el grupo tratado con etanol, tanto en hembras como en machos, siendo mayores las del primer sexo en comparación con los grupos tratados con etanol. Si equiparamos los grupos de rapamicina más etanol de machos y hembras, observamos que existen grandes diferencias significativas entre ellos, ocurriendo lo contrario que al analizar la fosforilación de CREB. Para analizar diferencias de sexo para la fosforilación de ERK, se utilizó Two-way ANOVA obteniendo que solo habían diferencias significativas entre los grupos de rapamicina más etanol al comparar ambos sexos.

En el caso de la corteza prefrontal, al analizar la fosforilación de ERK (Fig. 7), observamos el mismo acontecimiento que con la fosforilación de CREB, ya que no encontramos diferencias significativas al comparar ningún grupo, ni dentro del mismo sexo, ni entre ellos.

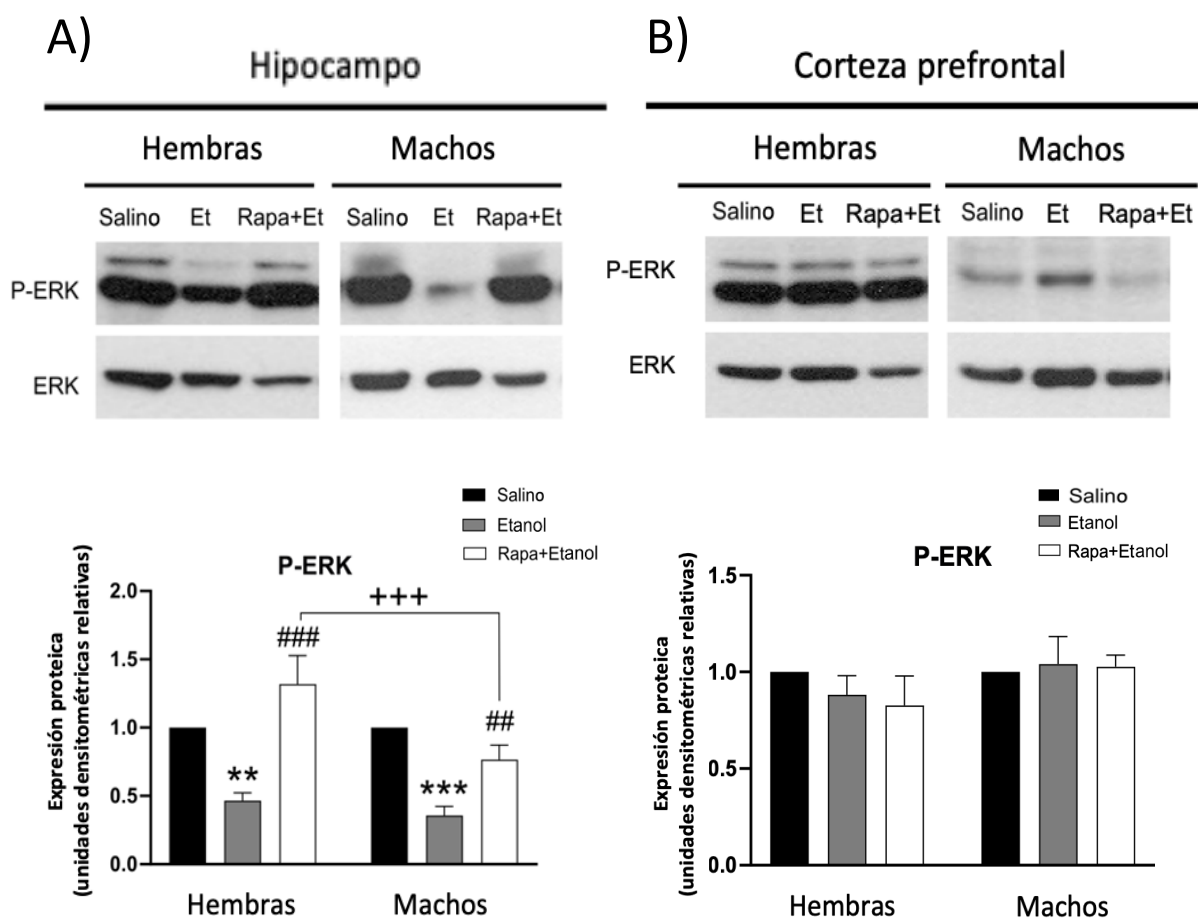


Figura 7. Expresión de la fosforilación de la proteína quinasa ERK. (A) Western Blot y cuantificación de la proteína quinasa ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) en su forma fosforilada y sin fosforilar de hipocampo de ratones hembras y machos DPN44 (Día postnatal 44) sometidos a tratamientos con solución salina, etanol y rapamicina más etanol, administrada 1 hora previa al alcohol. **(B)** Western Blot y cuantificación de la proteína quinasa ERK en su forma fosforilada y sin fosforilar de corteza prefrontal de ratones hembras y machos DPN44 sometidos a tratamientos con solución salina, etanol y rapamicina más etanol, administrada 1 hora previa al alcohol. Los datos están representados como media \pm SEM (Error estándar de la media), $n = 6$, ** $p < 0,01$ comparado con el grupo de salino, *** $p < 0,001$ comparado con el grupo de salino, ## $p < 0,01$ comparado con el grupo de etanol, ### $p < 0,001$ comparado con el grupo de etanol, +++ $p < 0,001$ diferencia entre géneros.

4.3. Función del papel de Akt en la activación de CREB inducida por el tratamiento intermitente de alcohol en ratones adolescentes e implicación de la autofagia en estos efectos.

Cuando evaluamos la fosforilación de Akt en hipocampo (Fig. 8), quinasa que puede participar en la fosforilación de CREB (Fig. 4), podemos ver que se presenta una situación diferente a las otras dos expresiones proteicas analizadas, ya que no existen diferencias significativas entre ningún grupo dentro del mismo sexo ni diferencias entre el mismo grupo en diferentes sexos.

En la figura 8, siguiendo los objetivos presentados en el presente estudio, únicamente se ha presentado la expresión de la fosforilación de Akt en hipocampo, puesto que debida a la situación acontecida en los últimos meses fue imposible llevar a cabo los experimentos en el laboratorio para determinar la expresión de la fosforilación de Akt en machos y en hembras en la corteza prefrontal.

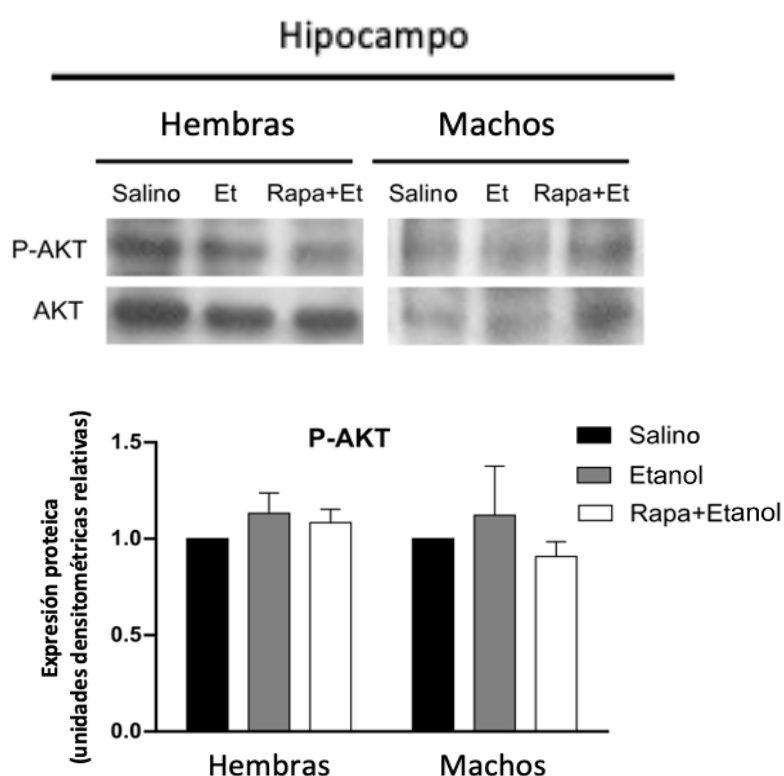


Figura 8. Expresión de la fosforilación de la proteína quinasa Akt. Western Blot y cuantificación de la proteína quinasa Akt (*Protein kinase B*) en su forma fosforilada y sin fosforilar de hipocampo de ratones hembras y machos DPN44 (Día postnatal 44) sometidos a tratamientos con solución salina, etanol y rapamicina más etanol, administrada 1 hora previa al alcohol. Los datos están representados como media \pm SEM (Error estándar de la media), $n = 6$.

5. Discusión

El factor de transcripción CREB es esencial en cuanto a las actividades que puede desarrollar el cerebro, habiéndose mostrado que deficiencias en su activación, se asocian con déficits de memoria espacial y contextual, entre otras (Bourtchuladze et al., 1994).

Estudios anteriores establecen que CREB interviene en la potenciación del hipocampo a largo plazo (LTP), un proceso que consiste en el fortalecimiento de las sinapsis mediante la propia estimulación de las neuronas, y se considera uno de los mecanismos subyacentes en la plasticidad sináptica. Por tanto, una reducción en la activación de CREB puede tener relevancia en las alteraciones del proceso de autofagia, ya que la reducción en la fosforilación de CREB se asocia con alteraciones en el desarrollo de la maduración sináptica y desajustes cognitivos. Además, que CREB es una diana de regulación de las proteínas quinasas ERK y Akt (Liu et al., 2013), las cuales participan en procesos importantes como la consolidación de la memoria y de la proliferación y diferenciación de los progenitores neurales del hipocampo (Barco et al., 2003).

En este estudio demostramos que el consumo de alcohol en forma de atracón en ratones adolescentes produce una menor fosforilación de CREB y ERK en hipocampo y por tanto un bloqueo de esta ruta, pero no de Akt ya que en este caso la fosforilación es similar en los grupos tratados con etanol y con suero fisiológico. Del mismo modo establecemos que la rapamicina es capaz de recuperar los valores de fosforilación estándar después de haber sufrido un tratamiento con alcohol, demostrando la importancia de la ruta de mTOR en aquellos procesos relacionados con la plasticidad sináptica y el desarrollo de la memoria. En relación a las diferencias de sexo, observamos que el tratamiento con rapamicina, previo a la administración del alcohol, es más efectivo en hembras que en machos, sugiriendo que este inhibidor de mTOR se comporta diferente dependiendo del sexo del ratón, abriendo nuevas vías de investigación con respecto a este hecho.

Por otro lado, cuando observamos los resultados en corteza prefrontal vemos que no hay diferencias significativas en ninguna de las proteínas analizadas, sugiriendo que los efectos del alcohol o no son suficientemente importantes como para observarse como diferencias significativas, o pueden estar produciéndose a través de otras rutas de señalización.

Como ya se ha comentado en la Introducción, la adolescencia es una etapa muy relevante en la maduración del cerebro, en la cual diversos cambios estructurales tanto plásticos como dinámicos ocurren. Es necesario que se controlen de forma muy estricta para el correcto desarrollo de la memoria y las funciones ejecutivas, entre otras, correspondiendo al hipocampo y a la corteza prefrontal respectivamente.

La autofagia, proceso que participa en la eliminación de compuestos de deshecho que las células no necesitan, juega también un papel importante en la plasticidad cerebral eliminando sinapsis no funcionales. El alcohol se ha demostrado que produce fallos en dicho proceso, por ejemplo, alterando los niveles de proteínas sinápticas estructurales excitatorias como SHANK3 y PSD-95 y ocasionando neuroinflamación y problemas de mielinización.

Paralelamente, el factor de transcripción CREB es una diana de regulación de dos proteínas quinasas, MAPK/ERK y Akt/PKB. Mediante diversos análisis se ha comprobado que la regulación de la expresión génica por CREB, mediante Ca^{2+} , en neuronas de hipocampo requiere de la señalización de ERK (Impey et al., 1998), por tanto, esta proteína es importante entre otros procesos en la maduración sináptica. En relación a Akt, diversos estudios han demostrado que CREB regula la expresión génica mediante su fosforilación por parte de Akt en la posición Ser-133, activando de la misma forma al coactivador CBP (*CREB-binding protein*) (Du y Montminy, 1998). Akt se ha demostrado que participa en el bloqueo de la apoptosis celular y estimula la supervivencia celular, siendo así relevante en el desarrollo cognitivo. En general estas proteínas están íntimamente relacionadas con los procesos que se analizan en este trabajo, siendo estos los alterados por la ingesta de alcohol.

Estudios previos realizados en el laboratorio de Patología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe han demostrado que el uso abusivo del alcohol produce un funcionamiento erróneo de la autofagia y de la maduración sináptica. Con los resultados de este estudio y de acuerdo con nuestros resultados, podemos establecer que estos fallos tienen una relación con la vía de señalización de CREB y mTOR. CREB se ha podido observar que, su aumento corresponde con una mayor vitalidad cerebral, incrementando los genes de supervivencia celular, y su disminución, con neurotoxicidad producida por el alcohol en el hipocampo.

Por último, hemos observado que Akt no muestra la misma reducción en fosforilación que el resto de proteínas en hipocampo de animales expuestos al alcohol. Se necesitan más estudios para dilucidar los efectos del etanol sobre la fosforilación de Akt en diferentes áreas cerebrales.

Finalmente, hay que destacar que datos del Laboratorio de Patología Celular del CIPF muestran la importancia de los procesos de autofagia en la plasticidad cerebral en hipocampo, ya que la inhibición de mTOR con rapamicina, no solo restaura la fosforilación del factor de transcripción CREB, el cual está implicado en la plasticidad cerebral, sino que también restaura las alteraciones en procesos de memoria y aprendizaje en el animal adolescente, abriendo nuevas vías para su tratamiento.

6. Conclusiones

Los efectos del alcohol en el organismo han sido objeto de estudio durante un largo periodo de tiempo por una gran variedad de grupos de investigación, incrementando progresivamente el conocimiento de los mecanismos de acción de esta sustancia. El presente trabajo demuestra que el abuso de alcohol durante la adolescencia disminuye tanto la fosforilación de CREB como de ERK, y en menor proporción en Akt, en el hipocampo de machos y hembras. Dentro de estos grupos, la única diferencia de sexos que se observa es entre los grupos tratados con rapamicina más etanol. También encontramos que en corteza prefrontal no se produce ninguna alteración en las proteínas estudiadas.

Trabajos en curso del Laboratorio del CIPF demuestran que la inhibición de mTOR, con rapamicina, no solo restaura los niveles de la fosforilación de CREB, sino también la plasticidad cerebral, en la que se incluyen procesos de memoria y aprendizaje asociados al hipocampo. Por tanto, estos resultados sugieren que la rapamicina podría ser un buen tratamiento para restaurar algunos efectos que ocasiona el alcohol en el cerebro adolescente.

7. Bibliografía

ALBERINI, C. M. (2009). Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiological reviews*, 89(1), 121-145.

BARAK, A. J., BECKENHAUER, H. C., & TUMA, D. J. (1985). Ethanol feeding inhibits the activity of hepatic N5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase in the rat. *IRCS Medical Science*, 13(8), 760-761.

BARCO, A., PITTENGER, C., & KANDEL, E. R. (2003). CREB, memory enhancement and the treatment of memory disorders: Promises, pitfalls and prospects. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 7(1), 101-114.

BARTZOKIS, G., BECKSON, M., LU, P. H., NUECHTERLEIN, K. H., EDWARDS, N., & MINTZ, J. (2001). Age-related Changes in Frontal and Temporal Lobe Volumes in Men: A Magnetic Resonance Imaging Study. *Archives of general Psychiatry*, 58(5), 461-465.

BOLAND, B., & NIXON, R. A. (2006). Neuronal Macroautophagy: From Development to Degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5-6), 503-519.

BOURCHULADZE, R., FRENGUELLI, B., BLENDY, J., CIOFFI, D., SCHUTZ, G., & SILVA, A. J. (1994). Deficient Long-Term Memory in Mice With a Targeted Mutation of the cAMP-responsive Element-Binding Protein. *Cell*, 79(1), 59-68.

CEDERBAUM, A. I. (2012). ALCOHOL METABOLISM. *Clinics in liver disease*, 16(4), 667-685.

CHARTIER, K. G., HESSELBROCK, M. N., & HESSELBROCK, V. M. (2010). Development and Vulnerability Factors in Adolescent Alcohol Use. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, 19(3), 493-504.

DE BELLIS, M. D., CLARK, D. B., BEERS, S. R., SOLOFF, P. H., BORING, A. M., HALL, J., KERSH, A., & KESHAVAN, M. S. (2000). Hippocampal Volume in Adolescent-Onset Alcohol Use Disorders. *The American journal of psychiatry*, 157(5), 737-744.

DU, K., & MONTMINY, M. (1998). CREB Is a Regulatory Target for the Protein Kinase Akt/PKB. *The Journal of biological chemistry*, 273(49), 32377-32379.

FERNANDEZ-LIZARBE, S., PASCUAL, M., & GUERRI, C. (2009). Critical Role of TLR4 Response in the Activation of Microglia Induced by Ethanol. *Journal of Immunology*, 183(7), 4733-4744.

Bibliografía

GOGTAY, N., GIEDD, J. N., LUSK, L., HAYASHI, K. M., GREENSTEIN, D., VAITUZIS, A. C., NUGENT, T. F., HERMAN, D. H., CLASEN, L. S., TOGA, A. W., RAPOPORT, J. L., & THOMPSON, P. M. (2004). Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8174-8179.

HENRIKSEN, T. B., HJOLLUND, N. H., JENSEN, T. K., BONDE, J.P., ANDERSSON, A., KOLSTAD, H., ERNST, E., GIWERCMAN, A., SKAKKEBAEK, N. E., & OLSEN, J. (2004). Alcohol Consumption at the Time of Conception and Spontaneous Abortion. *American Journal of Epidemiology*, 160(7), 661-667.

IMPEY, S., OBRIETAN, K., WONG, S. T., POSER, S., YANO, S., WAYMAN, G., DELOULME, J. C., CHAN, G., & STORM, D. R. (1998). Cross Talk Between ERK and PKA Is Required for Ca²⁺ Stimulation of CREB-dependent Transcription and ERK Nuclear Translocation. *Neuron*, 21(4), 869-883.

LEE A. J. (2012). Neuronal Autophagy: A Housekeeper or a Fighter in Neuronal Cell Survival?. *Experimental neurobiology*, 21(1), 1-8.

LIU, Y., ZHENG, Q., WU, H., GUO, X., LI, J., & HAO, S. (2013). Rapamycin Increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A Through ERK Under Normoxia. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45(4), 259-267.

MA, K., BALOCH, Z., HE, T., & XIA, X. (2017). Alcohol Consumption and Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis. *Medical Science Monitor*, 23, 238-246.

MCQUEENY, T., SCHWEINSBURG, B. C., SCHWEINSBURG, A. D., JACOBUS, J., BAVA, S., FRANK, L. R., & TAPERT, S. F. (2009). Altered White Matter Integrity in Adolescent Binge Drinkers. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 33(7), 1278-1285.

MIZUMOTO, A., OHASHI, S., HIROHASHI, K., AMANUMA, Y., MATSUDA, T., & MUTO, M. (2017). Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9), 1943.

MONTESINOS, J., PASCUAL, M., MILLÁN-ESTEBAN, D., & GUERRI, C. (2018). Binge-like Ethanol Treatment in Adolescence Impairs Autophagy and Hinders Synaptic Maturation: Role of TLR4. *Neuroscience Letters*, 682, 85-91.

MONTESINOS, J., PASCUAL, M., PLA, A., MALDONADO, C., RODRÍGUEZ-ARIAS, M., MIÑARRO, J., & GUERRI, C. (2015). TLR4 elimination prevents synaptic and myelin alterations and long-term cognitive dysfunctions in adolescent mice with intermittent ethanol treatment. *Brain, Behavior, and Immunity*, 45, 233-244.

Bibliografía

MONTESINOS, J., PASCUAL, M., RODRÍGUEZ-ARIAS, M., MIÑARRO, J., & GUERRI, C. (2016). Involvement of TLR4 in the long-term epigenetic changes, rewarding and anxiety effects induced by intermittent ethanol treatment in adolescence. *Brain, Behavior, and Immunity*, 53, 159-171.

NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. (s.f.). Drinking Levels Defined. Recuperado en Mayo 9, 2020, de <https://www.niaaa.nih.gov/alcohol-health/overview-alcohol-consumption/moderate-binge-drinking>

O'KEEFE, J. H., BHATTI, S. K., BAJWA, A., DINICOLANTONIO, J. J., & LAVIE, C. J. (2014). Alcohol and Cardiovascular Health: The Dose Makes the Poison...or the Remedy. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(3), 382-393.

PASCUAL, M., BLANCO, A. M., CAULI, O., MIÑARRO, J., & GUERRI, C. (2007). Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *European Journal of neuroscience*, 25(2), 541-550.

PASCUAL, M., MONTESINOS, J., & GUERRI, C. (2018). Role of the Innate Immune System in the Neuropathological Consequences Induced by Adolescent Binge Drinking. *Journal of neuroscience research*, 96(5), 765-780.

PASCUAL, M., MONTESINOS, J., MARCOS, M., TORRES, J., COSTA-ALBA, P., GARCÍA-GARCÍA, F., LASO, F., & GUERRI, C. (2017). Gender Differences in the Inflammatory Cytokine and Chemokine Profiles Induced by Binge Ethanol Drinking in Adolescence. *Addiction Biology*, 22(6), 1829-1841.

SAKAMOTO, K., KARELINA, K., & OBRIETAN, K. (2011). CREB: A multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *Journal of neurochemistry*, 116(1), 1-9.

SEOK, S., FU, T., CHOI, S. E., LI, Y., ZHU, R., KUMAR, S., SUN, X., YOON, G., KANG, Y., ZHONG, W., MA, J., KEMPER, B., & KEMPER, J. K. (2014). Transcriptional regulation of autophagy by an FXR/CREB axis. *Nature*, 516(7529), 108-111.

SHEHATA, M., & INOKUCHI, K. (2014). Does Autophagy Work in Synaptic Plasticity and Memory?. *Reviews in the Neurosciences*, 25(4), 543-557.

SOWELL, E. R., THOMPSON, P. M., HOLMES, C. J., JERNIGAN, T. L., & TOGA, A. W. (1999). In Vivo Evidence for Post-Adolescent Brain Maturation in Frontal and Striatal Regions. *Nature Neuroscience*, 2(10), 859-861.

SQUEGLIA, L. M., SPADONI, A. D., INFANTE, M. A., MYERS, M. G., & TAPERT, S. F. (2009). Initiating Moderate to Heavy Alcohol Use Predicts Changes in Neuropsychological Functioning for Adolescent Girls and Boys. *Psychology of addictive behaviors : journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*, 23(4), 715-722.

Bibliografía

TOGA, A. W., THOMPSON, P. M., & SOWELL, E. R. (2006). Mapping brain maturation. *Trends in neurosciences*, 29(3), 148-159.

TSANG, T. W., LUCAS, B. R., OLSON, H. C., PINTO, R. Z., & ELLIOTT, E. J. (2016). Prenatal Alcohol Exposure, FASD, and Child Behavior: A Meta-analysis. *Pediatrics*, 137(3), e20152542.

WAN, Q., LIU, Y., GUAN, Q., GAO, L., LEE, K. O., & ZHAO, J. (2005). Ethanol Feeding Impairs Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Isolated Rat Skeletal Muscle: Role of Gs Alpha and cAMP. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(8), 1450-1456.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2017c). *World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs*. World Health Organization.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2018). *Global status report on alcohol and health 2018*. World Health Organization.