

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



**“Estudio de las alteraciones cerebrales en
animales adultos expuestos al etanol durante la
gestación y/o durante la adolescencia tardía:
Mecanismos moleculares y celulares”**

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autor del trabajo:	D. Javier Cuitavi Martín
Localidad y fecha:	Valencia, junio 2016
Cotutor externo:	Dra. Consuelo Guerri Sirera
Tutor U.P.V.:	Prof. Dr. José Vicente Salvador Antón
Curso académico:	2015-2016



Título: Estudio de las alteraciones cerebrales en animales adultos expuestos al etanol durante la gestación y/o durante la adolescencia tardía: Mecanismos moleculares y celulares.

Resumen

El consumo medio de alcohol se ha incrementado en los últimos años debido tanto a un consumo cada vez más temprano de los adolescentes como al aumento del número de mujeres que lo consumen. Por tanto, los problemas derivados de esta ingesta de etanol han ido incrementándose de forma gradual, y se asocia a diversas enfermedades como puede ser la cirrosis hepática, además de otras patologías neurodegenerativas y neuroinflamatorias.

Se ha estudiado a fondo como afecta el alcohol a los adolescentes y se conoce con bastante profundidad los daños del Síndrome Alcohólico Fetal, presente en neonatos cuyas madres ingirieron alcohol con regularidad durante el embarazo. No obstante, hay diversas etapas de la vida en las cuales se desconoce prácticamente en su totalidad los efectos perjudiciales que puede causar el etanol. Asimismo, todavía se precisan esclarecer los mecanismos por los cuales la bebida induce una pérdida de masa cerebral, así como desencadena la respuesta inflamatoria a través del sistema inmune y sus receptores. En este trabajo se pretenden recoger datos sobre los efectos del etanol que se pueden mantener en el adulto, tras una exposición al alcohol durante algunos períodos críticos de su desarrollo, bien en una adolescencia tardía y/o incluso durante el período prenatal, cuyas madres consumieron alcohol durante la gestación, períodos vitales que pueden afectar en cierto grado al adulto.

Los ámbitos que se estudian en este trabajo comprenden las alteraciones que produce el alcohol en los procesos de mielinización, neuroinflamación, cambios epigenéticos e incluso en el daño neural asociado.

Palabras clave

Alcohol, Síndrome Alcohólico Fetal, Neuroinflamación, Daño cerebral y Epigenética.

Datos del trabajo

Autor del trabajo: D. Javier Cuitavi Martín
Localidad y fecha: Valencia-Junio 2016
Cotutor externo: Dra. Consuelo Guerri Sirera
Tutor U.P.V.: Prof. Dr. José Vicente Salvador Antón



Title: Study of the brain alterations on adult animals exposed to the ethanol during the pregnancy and/or the late adolescence: Molecular and cellular mechanisms.

Abstract

The alcohol consumption among the population has been increasing in the last years as teenagers start to drink younger than before and women also drink more now even if formerly they did not. Therefore, there are health problems originated due to growing alcohol consumption which accounts for a great amount of illnesses such as hepatic cirrhosis as well as neurodegenerative and neuroinflammatory diseases.

There are a lot of studies of how adolescents are affected by alcohol and foetal alcohol syndrome damage is well-documented which appears in neonates whose mothers drank alcohol regularly during pregnancy. However, there are several life periods in which the damaging effects that ethanol can cause are almost completely unknown. Also, the mechanisms by which the alcohol induces a loss of white matter in the brain as well as triggers the inflammatory response through the immune system and its receptors need to be elucidated. In this project data about the effects of ethanol that can be maintained in the adult is gathered after the alcohol exposition during some periods of the brain's development, either in an advanced adolescence and/or even during the prenatal period when mothers drank alcohol; vital periods which can affect to a certain degree the adulthood.

The fields that are studied in this project involve the alterations produced by the alcohol in the myelination processes, neuroinflammation, epigenetic changes and even alcohol-associated brain damage.

Key words

Alcohol, Foetal Alcoholic Syndrome, Neuroinflammation, Brain damage and Epigenetics.

Project data

Project author:	D. Javier Cuitavi Martín
Place and date:	Valencia-June 2016
External co-tutor:	Dra. Consuelo Guerri Sirera
U.P.V. tutor:	Prof. Dr. José Vicente Salvador Antón

AGRADECIMIENTOS

Hay tantas personas que me han ayudado a lo largo de los años, ya sea dando ánimos o con su mera presencia, que ahora resulta complicado este apartado, quizá el que más de todo el trabajo. Por tanto, si alguien es olvidado en papel que sepa que lo aprecio igualmente.

Para empezar, quisiera agradecer a mi familia que siempre ha estado apoyándome en todo momento, perdonándome los altibajos y mi frecuente mal humor. Mis padres guías de vida, siempre ahí cuando se les ha necesitado sin los cuales y sin cuyo esfuerzo constante no habría sido capaz de lograr mis propósitos. Mi queridísimo hermano, mi vida sería menos soportable sin nuestras riñas y risas, y ¿qué sería de mí sin esos paseos ingleses las tardes de agobio? A todos mis tíos y tías que nunca han dudado de mí. A mis primos y primas pequeños que hacen que se me ilumine la cara solo de verlos, y a los mayores que brindan grandes momentos familiares repletos de alegría. A mis abuelos y mi yaya que siempre han creído en mí y con los que tan grandes momentos he pasado en mi juventud, gracias por ayudarme a ser quien soy.

A todas las estrellas que pasasteis conmigo la carrera sin estrellaros, aguantar cuatro años conmigo tiene mucho mérito. Chicas sabéis que os quiero muchísimo y pese a que yo parezca que siempre lo tengo todo muy claro ha habido momentos en los que esta claridad se veía perturbada y vosotras me habéis conseguido iluminar de nuevo.

A mis grandes amigos, Abel, Marcos y Vicent, esos grandes hermanos que perdonan cuando hace falta y defienden con uñas y dientes a los suyos. Hemos tenido nuestros más y nuestros menos, pero al final todos cometemos errores y hay que pasar página. ¡Qué buenos años C.R.T. y por muchos más!

Muchísimas gracias al Centro de Investigación Príncipe Felipe por dejarme utilizar sus instalaciones y hacer que este trabajo fuera posible. En concreto, gracias a los chicos y chicas del departamento de Patología Celular y Molecular del Alcohol por no desesperar en todas mis faltas de novato ampliamente repetidas, especialmente a Consuelo Guerri que me acogió cuando aún no sabía que mi pasión era la neurociencia, y a Silvia Alfonso que me ha enseñado casi todo lo que sé con paciencia y con buena letra.

Por último, a mi yayo que me quería ver triunfar, pero sobre todo quería que fuera feliz, mi inspiración para lograr que otros tengan más fortuna que él. Siempre estará conmigo, en mi interior dándome fuerza cuando flaqueo y disfrutando los buenos momentos cuando sea tiempo de risa y diversión.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL ALCOHOL Y SU CONSUMO EN LA SOCIEDAD.	1
1. 2. EFECTOS DEL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.	2
1.2.1. Exposición al alcohol durante la etapa prenatal.	2
1.2.2. Efectos del alcohol en etapa prenatal: Síndrome Alcohólico Fetal.....	3
1.2.3. Efectos de la exposición al alcohol durante el período de lactancia.	4
1.2.4. Efectos perjudiciales del abuso de alcohol en la adolescencia.	4
1.2.5. ¿Cómo afecta la exposición al alcohol en las primeras etapas del desarrollo?: Susceptibilidad al alcoholismo en la edad adulta.	6
1.3. EL ALCOHOL Y EL SISTEMA INMUNE: NEURODEGENERACIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN. ..	7
1.3.1. Receptores inmunes y su papel en la neuroinflamación que causa el alcohol.....	7
1.4. EFECTOS DEL ALCOHOL EN LOS PROCESOS DE MIELINIZACIÓN.	8
1.5. CAMBIOS EPIGENÉTICOS DEBIDOS A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL.	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL Y MÉTODOS	12
3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	12
3.2. ADMINISTRACIÓN DE ETANOL A ANIMALES.	12
3.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN PROTEICA.	12
3.4. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.....	13
3.5. DETECCIÓN DE LA CITOCINA <i>IL-1β</i> MEDIANTE ELISA.	15
3.6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD HISTONA ACETILTRANSFERASA (HAT) Y DE LA ACTIVIDAD HISTONA DEACETILASA (HDAC).	15
3.7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.	15
4. RESULTADOS	16
4.1. ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES INMUNES EN EL ADULTO TRAS UNA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4/NLRP3 Y LA NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA.	16
4.1.1. Activación de TLR4/TLR2 y su cascada de señalización.....	16
4.1.2. Activación y translocación al núcleo de NFκB/p65 y producción de mediadores inflamatorios, iNOS y COX-2.....	17
4.1.3. Activación del inflamasoma NLRP3/Caspasa-1.	18
4.1.4. Activación y liberación de “IL-1β” asociada a procesos de neuroinflamación.	19
4.2. ALTERACIONES DE MIELINA MANTENIDAS EN EL ADULTO TRAS UNA EXPOSICIÓN TEMPRANA AL ALCOHOL EN PERÍODOS CRÍTICOS DEL DESARROLLO.	20

4.3. CAMBIOS EPIGENÉTICOS DEBIDOS A LA EXPOSICIÓN TEMPRANA AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.....	21
4.4. DAÑO CEREBRAL ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA TEMPRANA.	24
5. DISCUSIÓN.....	25
5.1. NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4/NLRP3.	25
5.1.1. Activación de los receptores tipo Toll (TLR4) asociados a la exposición al alcohol durante etapas tempranas del desarrollo.....	25
5.1.2. Interrelación entre los receptores inmunes TLR4 y NLRP3 tras un abuso de alcohol en el desarrollo: Papel del inflamasoma NLRP3.....	26
5.1.3. Producción de IL-1 β , citocina proinflamatoria implicada en la neuroinflamación tras una exposición al alcohol durante el desarrollo.	26
5.2. ALTERACIONES EN MIELINIZACIÓN DEBIDAS A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.	27
5.3. LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA TEMPRANA PRODUCE CAMBIOS EPIGENÉTICOS.	28
5.4. DAÑO NEURAL ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO.....	28
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Cerebro de niño afectado por SAF (Izquierda) y cerebro de un niño sano (Derecha)....	3
Figura 2. Efectos del alcohol en el desarrollo durante la ontogenia del Sistema Nervioso Central en humanos y ratas. NSCs, células madre neurales; F, fetal; P, postnatal.....	4
Figura 3. Maduración de las diferentes áreas del cerebro.....	5
Figura 4. Edad de inicio del consumo de alcohol y antecedentes familiares de alcoholismo. Relación con la prevalencia de su abuso y dependencia en el adulto. Sin antecedentes familiares de alcoholismo (FHN) y con antecedentes familiares de alcoholismo (FHP).....	6
Figura 5. Papel de los receptores inmunes, TLR4 y NLRP3 en la neuroinflamación causada por el alcohol.....	8
Figura 6. Vaina de mielina en un ratón sano (Izquierda) y con consumo crónico de alcohol (derecha).....	9
Figura 7. Modificaciones epigenéticas tras la ingesta de alcohol.....	10
Figura 8. Cambios en la expresión de los niveles de receptores inmunes TLR4 y TLR2 en el córtex prefrontal e hipocampo tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	16
Figura 9. Translocación al núcleo del factor de transcripción NFκB/p65 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	17
Figura 10. Liberación de mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	18
Figura 11. Niveles de NLRP3 y Caspasa-1/p10 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	19
Figura 12. Variación de los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1β (pg/mg proteína) en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo..	19
Figura 13. Niveles de expresión del factor de transcripción MYRF en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	20
Figura 14. Alteraciones en las proteínas implicadas en procesos de mielinización en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	21
Figura 15. Niveles de actividad de histona deacetilasa (HDAC) e histona acetilasa (HAT) en la corteza prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	22
Figura 16. Cambios epigenéticos asociados con acetilaciones y metilaciones en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo.....	23

Figura 17. Daño neural asociado a la neuroinflamación producida en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al de alcohol durante la ontogenia temprana.....	24
Tabla 1. Listado de los anticuerpos primarios utilizados.....	13
Tabla 2. Listado de los anticuerpos secundarios utilizados.....	15

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ALCOHOL Y SU CONSUMO EN LA SOCIEDAD.

El consumo excesivo de alcohol es la tercera causa de muerte prevenible en muchos países según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ("World Health Organization", 2008) y está asociado con varios efectos adversos, entre los cuáles se encuentran la cirrosis hepática, diversos tipos de cáncer, y otros como adicción, daño cerebral e incluso violencia. Según la publicación "Global Status Report on Alcohol" (2004 y 2009) de la OMS, se estima que 76 millones de personas en todo el mundo han sido diagnosticadas con desórdenes derivados del consumo de alcohol (World Health Organization, 2008). De hecho, recientemente existe un estudio realizado en Reino Unido que clasifica las drogas por nivel de daño en general, donde se demuestra que el alcohol es la droga más perjudicial (Nutt et al., 2010).

A pesar de las consecuencias que genera el abuso de alcohol en la salud, ésta es una de las drogas más comunes y de mayor adicción, de hecho, un consumo elevado, prolongado y continuo podría llegar a causar daños cerebrales importantes. Incluso en estudios post-mortem realizados en alcohólicos que no presentaban problemas hepáticos o neurológicos específicos, se han observado signos de daño importantes en distintas regiones cerebrales como son alteraciones estructurales en las vainas de los axones de mielina, pérdidas de masa cerebral y severas disfunciones cognitivas (Harper, 2005).

Algunos estudios, indican claramente que el alcohol es un componente neurotóxico con efectos directos sobre las células nerviosas (Pascual et al., 2009). Al mismo tiempo, un consumo excesivo de alcohol se encuentra asociado con distintos procesos inflamatorios al igual que ocurre en otras enfermedades de tipo neurológico o neurodegenerativo. Además, el abuso crónico de alcohol normalmente empieza con procesos de experimentación, que progresivamente derivan en adicción tras un consumo prolongado. De hecho, los daños asociados al consumo crónico de alcohol, podrían contribuir a la progresión en los procesos de adicción (Harper, 2005).

Actualmente, existe una tendencia al consumo de alcohol en edades cada vez más tempranas, que junto con el aumento en el número de mujeres que beben en exceso, implica un incremento en los riesgos que conlleva el alcohol en los jóvenes o adolescentes y también en la prole o descendencia de éstas mujeres, respectivamente. De hecho, la prevalencia de problemas relacionados con el alcohol y déficits neurológicos asociados en adolescentes, es un problema de salud pública global (Jernigan, 2001). Existen distintos estudios realizados en 35 países europeos por la "European School survey Project on Alcohol and Other Drugs" (ESPAD) (Hibell et al., 2009), los cuáles indican que las personas jóvenes hoy en día beben más y con un claro objetivo de embriaguez mayor al de generaciones anteriores. En este estudio se recoge un 43% de estos casos de embriaguez en adolescentes de 16 años durante un período de 30 días. Incluso hay países cuyas tasas superan el 50% (ej. UK, 54%; Portugal, 56%) y la mayoría de los países tienen ratios superiores al 30%. En Estados Unidos, algunos estudios han recogido datos que indican que aproximadamente un tercio de los estudiantes de bachillerato abusan del alcohol (Johnson et al., 2010). Además, se ha observado un incremento notable en el consumo de alcohol en adolescentes en algunos países del Pacífico oeste, incluyendo Australia y Nueva Zelanda, elevando sustancialmente las medias de consumo en estos países (Jernigan, 2001).

Distintos trabajos de investigación indican que existe una organización sutil neuroquímica, celular, sináptica y estructural en el cerebro adolescente (Gogtay et al., 2004; Giedd, 2004), contribuyendo a que presente una mayor vulnerabilidad que en el cerebro adulto, frente a posibles efectos adversos debidos a ciertas actividades como, por ejemplo, el "botellón". Asimismo, alteraciones en procesos de memoria inducidos por el alcohol, como el "black-out",

y otros efectos cognitivos, son particularmente comunes entre los adolescentes que consumen alcohol y pueden ser, al menos en parte, debidos a alteraciones de la plasticidad neural en el córtex prefrontal (CPF) y en el hipocampo (Crego et al., 2009). Por otro lado, la adolescencia se caracteriza por una rápida maduración del sistema cerebral que media la recompensa, y distintos cambios hormonales asociados a procesos de estrés (Ceccarelli et al, 2007; Crews et al., 2007), eventos que podrían potenciar la ansiedad y participar en la iniciación del patrón de consumo de alcohol u otras drogas, puesto que está demostrado que existe una correlación positiva entre el consumo de alcohol y la probabilidad de desarrollar problemas derivados de este consumo en los adolescentes.

Un aspecto adicional que hay que tener en cuenta en las acciones del alcohol sobre el cerebro, es su efecto tóxico durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC). De hecho, el alcohol es una de las sustancias más comunes e importantes que afectan al cerebro en los distintos estadios del desarrollo fetal, debido a que su consumo durante el embarazo puede producir un amplio rango de anomalías cognitivas, conductuales y físicas. Asimismo, es una de las principales causas prevenibles frente a posibles anomalías o desórdenes en el desarrollo del sistema nervioso del neonato (American Academy of Pediatrics, 2000). En los casos más severos, se observa un patrón de malformaciones, cuyo conjunto se conoce como Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) (Jones y Smith, 1973). Sin embargo, los efectos de la exposición prenatal al alcohol recaen en un continuo de anomalías físicas y deficiencias conductuales y cognitivas, adoptándose un nuevo término conocido como " fetal alcohol spectrum disorders " (FASD) (Sokol et al., 2003). Además, mediante novedosas técnicas de neuroimagen y estudios experimentales, se demuestra la vulnerabilidad del SNC al efecto del alcohol, revelando que los efectos no son uniformes y que algunas áreas cerebrales o poblaciones celulares son más vulnerables que otras (Guerra, 2002; Guerra et al., 2009).

En este trabajo, se recoge el conocimiento actual de los mecanismos celulares y moleculares que participan en los efectos del alcohol en el cerebro adolescente y/o en desarrollo, que pueden llegar a mantenerse o afectar en etapas adultas, además de su correlación con los posibles déficits estructurales, cognitivos, conductuales y psicopatológicos observados en estos individuos con exposición temprana y/o adolescente al alcohol.

1. 2. EFECTOS DEL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.

1.2.1. Exposición al alcohol durante la etapa prenatal.

A pesar de la evidencia de que consumir alcohol durante el embarazo es dañino para el desarrollo normal del feto, más del 10% de las mujeres en Estados Unidos admiten consumir alguna cantidad de alcohol en este período (Tan et al., 2011-2013).

El desarrollo del SNC empieza tras la fecundación, formándose el tubo neural durante los primeros días, por ello, es uno de los sistemas que se ven mayormente afectados por un consumo de alcohol de las madres gestantes.

Durante los meses que siguen a la implantación del embrión, se definen las áreas cerebrales gracias a la proliferación y diferenciación de las células madre precursoras. Asimismo, se produce una migración neuronal que permite la formación de todo lo que será el sistema nervioso periférico responsable del control sobre el resto de aparatos y sistemas. A pesar de todos estos cambios, hay neuronas y otras células nerviosas como las células de la glía, que no logran adaptarse o que han cumplido su función, y entran en apoptosis para dejar lugar a nuevas células más adaptadas y especializadas. Además, el máximo crecimiento del cerebro se produce en las últimas semanas que anteceden al parto.

1.2.2. Efectos del alcohol en etapa prenatal: Síndrome Alcohólico Fetal.

Durante las últimas tres décadas, estudios clínicos y experimentales han provisto evidencias directas de que el cerebro en desarrollo es especialmente vulnerable a los efectos tóxicos del alcohol y el abuso del mismo durante el embarazo. Esto puede causar daño cerebral permanente en la descendencia, el cual va asociado con desórdenes sociales y cognitivos (Guerra et al., 2009; Mattson y Riley, 1998; Streissguth, 1991). En 1973, Jones y Smith describieron los efectos teratogénicos del alcohol en humanos y acuñaron el término de Síndrome Alcohólico Fetal (SAF) a un conjunto de anomalías craneales y faciales. Sin embargo, los efectos de la exposición prenatal junto a las anomalías físicas y los déficits comportamentales y cognitivos se han acuñado con el término FASD (desórdenes del espectro fetal del alcohol), como ya hemos mencionado anteriormente, término que se ha adoptado como general y que describe todos los efectos dañinos que causa el alcohol en este período.

Estudios posteriores de este síndrome lo correlacionaron con anomalías aún mayores del SNC y otras tantas cognitivas, motoras y conductuales, pudiendo llevar a hiperactividad o retraso cerebral. La prevalencia del SAF en Estados Unidos es de entre 0.5 y 2 casos por cada mil neonatos en la población general y de 1.4 a 9.8 casos por cada mil nacidos en grupos de población de alto riesgo (American Academy of Pediatrics, 2000). En general, la severidad del SAF está ligada a la dosis de alcohol, la duración y el patrón de consumo durante el embarazo. Además, es mucho más peligroso el patrón conocido como “atracción” (*binge drinking*) en donde se alcanzan altos niveles de alcohol en el feto, que la exposición a la misma cantidad de alcohol tomada durante un período prolongado.

En el SAF se ha visto que se reduce el volumen cerebral (ver Figura 1), donde se producen anomalías prominentes, incluyendo el desplazamiento del cuerpo caloso, cerebelo y tractos corticoespinales en los cuales, la extensión del daño correlaciona con la severidad del fenotipo del SAF y con déficits neurocognitivos (Wozniak y Muetzel, 2011).

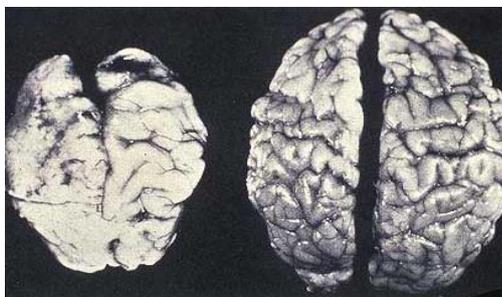


Figura 1. Cerebro de niño afectado por SAF (Izquierda) y cerebro de un niño sano (Derecha). Imagen obtenida de Gilbert, 2003.

En las etapas iniciales de la embriogénesis, el etanol tiene efectos negativos profundos en la supervivencia y proliferación de células progenitoras, como se muestra en la Figura 2, lo cual podría ser la causa de la microencefalopatía en el SAF. De las semanas 7 a 20 cuando se produce el pico de proliferación y migración de células neuroepiteliales, la exposición al etanol altera el patrón de migración neuronal y el destino celular. Las consecuencias del cambio en el destino celular incluyen reducciones en poblaciones de neuronas y de células de la glía en el neocórtex, hipocampo y núcleos sensoriales (Guerra et al., 2009).

En el tercer trimestre del embarazo, la exposición al alcohol afecta al crecimiento cerebral y por tanto, interfiere en el desarrollo de los astrocitos, oligodendrocitos, sinaptogénesis e incluso en el desarrollo del cerebelo. Asimismo, existen estudios que demuestran que la exposición al etanol durante este período altamente vulnerable, puede producir procesos de apoptosis importantes en el cerebro del feto en desarrollo (Young et al., 2005).

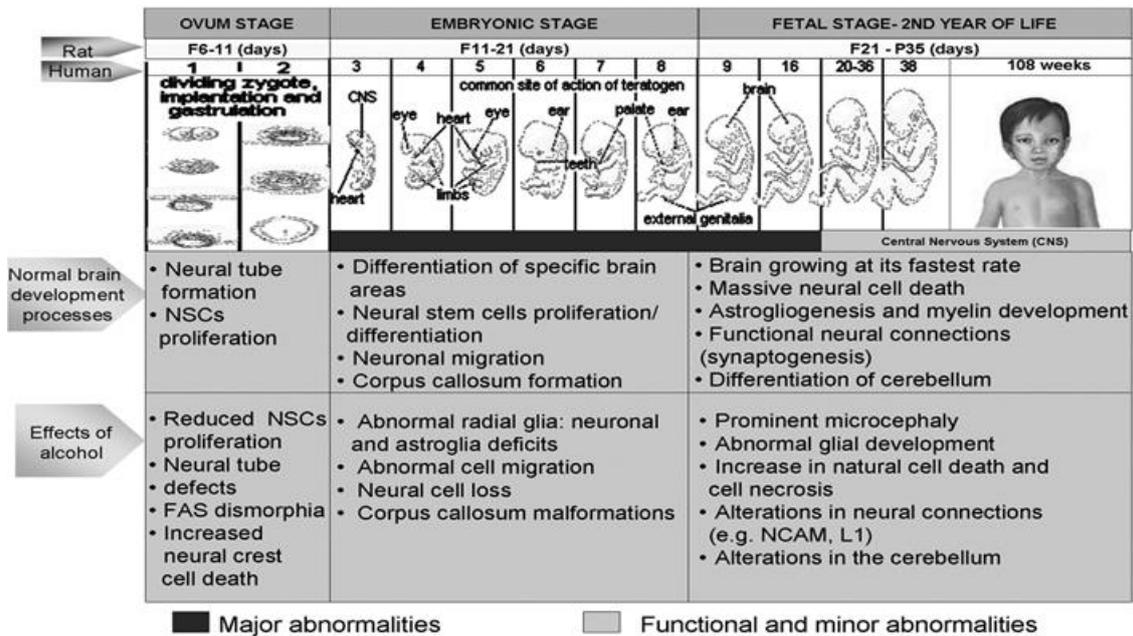


Figura 2: Efectos del alcohol en el desarrollo durante la ontogenia del Sistema Nervioso Central en humanos y ratas. NSCs, células madre neurales; F, fetal; P, postnatal. Imagen adaptada de *Persaud y Moore, 1973*.

1.2.3. Efectos de la exposición al alcohol durante el período de lactancia.

El alcohol es un compuesto tóxico que se transfiere a través de la leche materna humana, alcanzando niveles similares a los que se pueden encontrar en el suero materno, de hecho, la mayor concentración de alcohol en la leche se registra entre los 30-90 minutos tras la ingesta. Sin embargo, según la Academia de Pediatría Americana, la lactancia estaría permitida dependiendo de la dosis diaria de alcohol que se consuma, de modo que para que una madre pueda amamantar tras la ingesta de alcohol, debe esperar alrededor de dos a tres horas para hacerlo (Little et al., 2002). Los efectos adversos más conocidos que se derivan de una ingesta por parte de la madre incluyen entre otros; somnolencia, elevada sudoración, sueño profundo, debilidad, disminución en la tasa de crecimiento, ganancia anormal de peso y un decremento en la producción de leche (Ornoy y Ergaz, 2010).

En cuanto a los efectos que tiene el alcohol en el recién nacido, es importante saber que está expuesto a una fracción del alcohol consumido por la madre, no obstante, en las primeras semanas de vida, la eliminación del alcohol del organismo tiene un rendimiento mucho menor que en un adulto. Los efectos adversos más característicos que pueden experimentar los lactantes expuestos al alcohol, son cambios en los patrones de sueño, una menor ingesta de leche, presencia de alteraciones del desarrollo motor e hipoglucemia (Koren, 2002) entre otros, de hecho, incrementa el riesgo de muerte súbita (5% de los bebés durante la lactancia).

1.2.4. Efectos perjudiciales del abuso de alcohol en la adolescencia.

Se ha observado que el cerebro humano está en fase de desarrollo durante la adolescencia, representando ésta un estadio de transición entre el niño y el adulto, y alcanzando su madurez hacia los 21-23 años (Giedd, 2004; Toga et al., 2006). En la adolescencia, pese a que el tamaño cerebral es equiparable al de un adulto, ocurren importantes cambios en los circuitos de conexión en el interior del cerebro. Algunos de los cambios más trascendentales tienen lugar en la CPF y en los sistemas límbicos y mesolímbicos. Esto es así, debido a que el proceso de maduración del cerebro acontece de manera asincrónica, iniciándose en las regiones posteriores y avanzando hacia la zona frontal (Gogtay et al., 2004). Así, las regiones límbicas subcorticales, como el estriado, el núcleo accumbens (NAc) o la amígdala, involucradas en el

sistema de recompensa y de motivación de las conductas de búsqueda de estímulos placenteros, aumentan su actividad durante la adolescencia, aunque su maduración ocurre antes que la región cortical prefrontal, implicada en la toma de decisiones, la planificación y la inhibición de conductas impulsivas (Bava y Tapert, 2010). Este desequilibrio entre las áreas maduras que motivan la búsqueda de recompensa y las áreas inmaduras (CPF), que planifican e inhiben este impulso, favorece que el individuo adopte conductas exploratorias de alto riesgo hacia estímulos novedosos (Hittner y Swickert, 2006). Por ello, la inmadurez de la arquitectura del cerebro, que lo dota de alta impulsividad y baja inhibición, se considera una de las principales causas que pueden conllevar al inicio del consumo de alcohol en la adolescencia (Silveri, 2012). En la Figura 3, se aprecia cómo va madurando el cerebro a lo largo de la adolescencia.

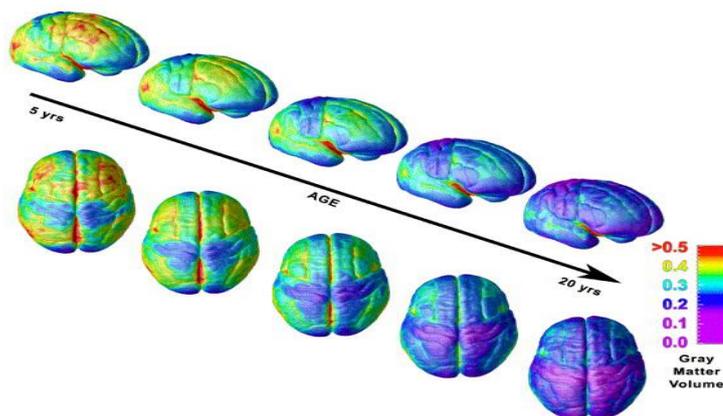


Figura 3: Maduración de las diferentes áreas del cerebro. Imagen tomada de Gotay et al., 2004.

Un gran número de trabajos han demostrado que, con los mismos niveles de alcohol, el cerebro adolescente es más vulnerable que el cerebro adulto a los efectos neurotóxicos del alcohol (Pascual et al., 2009; Vetreno et al., 2014). Las regiones que están en fase de maduración y mantienen su capacidad de plasticidad, como la CPF y el hipocampo, son de hecho, dianas a los efectos del alcohol (Guerra y Pascual, 2010). Así, la administración intermitente de alcohol, incrementa la muerte neural en CPF e hipocampo (Pascual et al., 2007), altera su plasticidad (Liu y Crews, 2015), afecta la formación de la mielina en estas regiones cerebrales (Alfonso-Loeches and Guerra, 2011; Pascual et al., 2014) y la formación de la sinapsis en CPF (Montesinos et al., 2015). Además, se ha visto que altas dosis de alcohol también inhiben la neurogenesis y aumenta la muerte neuronal en hipocampo de adolescentes, pero no en adultos, alterando las funciones cognitivas asociadas al hipocampo en la edad adulta (Broadwater et al., 2014; Ehlers et al., 2013). Gran parte de las alteraciones estructurales en las diferentes regiones cerebrales, así como los cambios en la mielina y en las sinapsis inducidas por el abuso de alcohol durante la adolescencia se han relacionado con disfunciones en procesos de memoria, aprendizaje y función ejecutiva. Además, muchas de estas disfunciones cognitivas se mantienen hasta la edad adulta, en animales expuestos sólo durante la adolescencia, indicando que los cambios son permanentes e irreversibles ya que se mantienen en la edad adulta (Pascual et al., 2007; Montesinos et al., 2015; Coleman et al., 2014; Crews et al., 2007; Broadwater et al., 2014).

El abuso de alcohol en adolescentes, causa diferentes alteraciones tanto en la sustancia gris (neuronas) como en la sustancia blanca (mielina) afectando la actividad cerebral y dando lugar a deficiencias en las pruebas cognitivas que evalúan diversos procesos como son la memoria espacial, verbal, visual y la función ejecutiva. Además, los jóvenes procedentes de familias con antecedentes en alcoholismo, suelen ser más vulnerables a los efectos neurotóxicos del alcohol (Squeglia et al., 2014). Asimismo, estudios longitudinales demuestran que el abuso de alcohol durante la adolescencia, acelera la reducción de materia gris en el córtex lateral frontal

y temporal además de reducir el incremento de materia blanca en ciertas regiones cerebrales, como el cuerpo calloso. Estas alteraciones se producen de forma semejante en adolescentes de ambos sexos (Pascual, 2007).

1.2.5. ¿Cómo afecta la exposición al alcohol en las primeras etapas del desarrollo?: Susceptibilidad al alcoholismo en la edad adulta.

Estudios epidemiológicos, clínicos y básicos demuestran que el consumo de alcohol en épocas cruciales para el desarrollo del Sistema Nervioso Central supone un factor de vulnerabilidad para padecer trastornos psiquiátricos, en particular trastornos por uso drogas como el alcohol (Baer et al., 2003; Kelly et al., 2009; Guerri et al., 2009).

Niveles elevados de acetaldehído, que es el producto tóxico intermediario del metabolismo del alcohol, pueden deberse al polimorfismo de los loci que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y/o la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) (Luczak et al., 2006). Varios estudios han demostrado que cierta combinación de polimorfismos en los alelos de estos genes, desemboca en una alta predisposición al alcoholismo (Konishi et al., 2003; Kang et al., 2009). Asimismo, se ha comprobado que hay un alto riesgo de consumo de alcohol por parte de adolescentes cuyas madres consumieron etanol durante y tras el embarazo (Alati et al., 2008; Baer et al., 2003). No obstante, el mecanismo que subyace en este incremento por la preferencia hacia el alcohol tras una exposición prenatal, es desconocido. De hecho, algunos estudios sugieren que la detección del sabor del alcohol en el seno materno hace que el nonato (feto) aprenda por asociación, es decir, las propiedades quimiosensoriales del etanol se asocian como un refuerzo hacia la droga, provocando dependencia. Este proceso debe llevar a una búsqueda e ingesta de alcohol más elevada que la habitual durante la adolescencia o la adultez. Esto se ha visto que es debido a que el etanol activa el sistema opioide favoreciendo esta dependencia temprana (Díaz-Cenzano y Chotro, 2010). Otros estudios indican que el etanol prenatal induce tolerancia a los efectos derivados del alcohol (Pautassi et al., 2012).

Además, se ha comprobado que la edad en la que se comienza a ingerir alcohol voluntariamente, la adolescencia, tiene gran relevancia en la posterior dependencia al alcohol. De hecho, cuando más pronto se empiece a consumir, mayores son las posibilidades de que derive en un problema de alcoholismo, como se muestra en la Figura 4. Esto es debido a que al no estar el cerebro desarrollado por completo se activan los mecanismos de recompensa que, en última instancia, crearán la necesidad de un consumo repetido de alcohol para poder mantener niveles constantes de las sustancias de recompensa (Hingson y Zha, 2009).

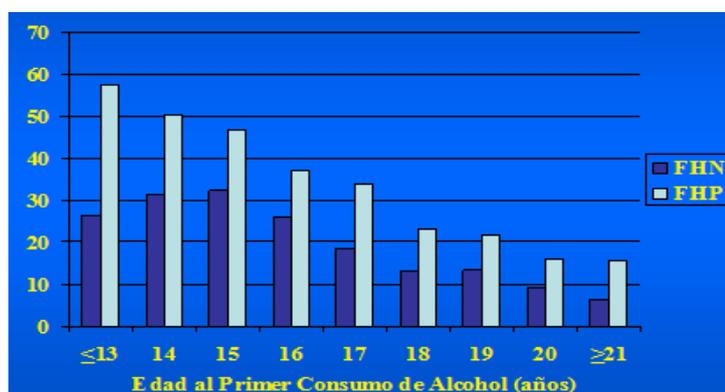


Figura 4. Edad de inicio del consumo de alcohol y antecedentes familiares de alcoholismo. Relación con la prevalencia de su abuso y dependencia en el adulto. Sin antecedentes familiares de alcoholismo (FHN) y con antecedentes familiares de alcoholismo (FHP). Gráfico obtenido de *Grant y Dawson, 1997*.

Asimismo, existen estudios que demuestran que los antecedentes familiares también predisponen al alcoholismo, como ya hemos mencionado anteriormente. Esto es así, puesto que como describiremos a continuación (apartado 1.5), se producen ciertos cambios epigenéticos cuando los progenitores consumen alcohol en exceso, cambios que pueden ser heredables, generando un consumo de etanol descontrolado como se muestra en la Figura 4.

1.3. EL ALCOHOL Y EL SISTEMA INMUNE: NEURODEGENERACIÓN Y NEUROINFLAMACIÓN.

El sistema inmune, tanto el innato como el adquirido, es la primera línea de defensa ante cualquier patógeno o sustancia tóxica (Zou y Crews, 2010). Diversos estudios demuestran que el alcohol es capaz de activar la respuesta inmunológica. Pruebas de ello es que tras un consumo de alcohol de larga duración, aumenta la incidencia de otras dolencias como neumonías (Moss et al., 2003; Joshi and Guidot, 2007; Witt, 2010) o enfermedades infecciosas como el VIH o la hepatitis C (Szabo y Mandrekar, 2009; Szabo y Zakhari, 2011). Pese a conocer que el etanol irrumpe la respuesta inmune, no se sabe exactamente cómo lo hace, a causa de la multitud de factores que hay que considerar cuando éste entra en contacto con el sistema inmune, como vienen siendo la dosis, el tiempo de exposición y el tipo de célula inmune con la que interactúa. Una posibilidad es que el etanol merma la habilidad de las células inmunitarias, como monocitos y macrófagos (Mandrekar et al., 2002), células dendríticas (Lau et al., 2006), linfocitos T (Szabo et al., 2004) y neutrófilos, de actuar frente a diferentes agresiones como son las infecciones (Bautista y Wang, 2001).

Además, la respuesta inmune adquirida se ve afectada por el etanol (Lau et al., 2009) de manera que se disminuye la presentación de antígenos en macrófagos y la proliferación de linfocitos T, lo que desemboca en una bajada de los niveles de citocinas proinflamatorias (Szabo et al., 2004).

1.3.1. Receptores inmunes y su papel en la neuroinflamación que causa el alcohol.

Para que se pueda desencadenar la respuesta inmune en el cerebro, es necesario que las células que participan en la misma, los astrocitos y la microglía, reconozcan mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) la infección. Los PRRs reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMPs) y patrones moleculares endógenos en respuesta al daño tisular (DAMPs). Los PRRs más relevantes son los receptores de membrana tipo Toll (TLRs) y los citoplasmáticos tipo NOD (NLRs) (Chen y Núñez, 2010).

1.3.1.1. TLRs y su relación con el alcohol.

Los TLRs son un tipo de PRRs del sistema inmune innato que están implicados en la primera línea de defensa frente a patógenos (Iwasaki y Medzhitov, 2004). No obstante, también son capaces de responder a derivados de moléculas endógenas como, por ejemplo, componentes liberados de células necróticas y otras moléculas que se producen como consecuencia de mecanismos patogénicos. En el sistema nervioso, los TLRs se expresan de manera mayoritaria en las células gliales (Okun et al., 2009). Su activación desencadena rutas de señalización que regulan las actividades de factores de transcripción como NF- κ B y AP-1, los cuáles son mediadores en la producción de citocinas como IL-1 β , especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO). Hay estudios que demuestran que los TLRs, concretamente el TLR4, es un componente crítico en la neuroinflamación y el daño cerebral. De hecho, se ha demostrado que el TLR4 tiene un papel fundamental en la neuroinflamación y neurodegeneración que causa el etanol en el cerebro (Alfonso-Loeches et al., 2010), así como en células de la microglía (Fernandez-Lizarbe et al., 2009) y astrocitos (Qin et al., 2008; Valles et al., 2004; Alfonso-Loeches et al., 2010; Zou y Crews, 2010).

1.3.1.2. NLRs y su relación con el alcohol.

Diversos estudios indican que la familia de los receptores NOD (nucleotide-binding oligomerization domain receptors) o NOD-like receptors (NLRs) participan en la formación del inflamasoma, complejos multiproteicos que activan el procesamiento proteolítico de la Caspasa-1, lo que desemboca en la liberación y/o secreción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-33 e IL-18. Entre todos los NLRs, el mejor descrito hasta el momento, es el NLRP3 o criopirina (Sutterwala et al., 2006). Los NLRs se activan, no sólo tras la exposición a PAMPs sino también, por DAMPs o alarminas, las cuales son indicativas de daño tisular y de ambientes irritantes (Schroder y Tschopp, 2010).

Hay estudios que demuestran una interrelación entre los TLRs y los NLRs (ver Fig. 5) en la secreción y maduración de IL-1 β durante la infección microbiana (Kahlenberg et al., 2005; Becker y O'Neill, 2007; Mariathasan y Monack, 2007). Asimismo, se ha comprobado que el alcohol activa al NLRP3 en el cerebro (Lippai et al., 2013; Alfonso-Loeches et al., 2014; 2015), postulándose además que existe un mecanismo donde el alcohol, mediante la activación de la cascada de señalización de TLR4, hace que se produzca la citocina pro-IL-1 (señal 1 o *priming*), que activa el inflamasoma NLRP3 mediante una segunda señal, como es el ROS mitocondrial en cultivo primario de astrocitos (Alfonso-Loeches et al., 2014). En la Figura 5, vemos la activación de la ruta neuroinflamatoria en respuesta al consumo de alcohol, donde se produce la liberación y secreción de mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2) y citocinas (IL-1 β e IL-18).

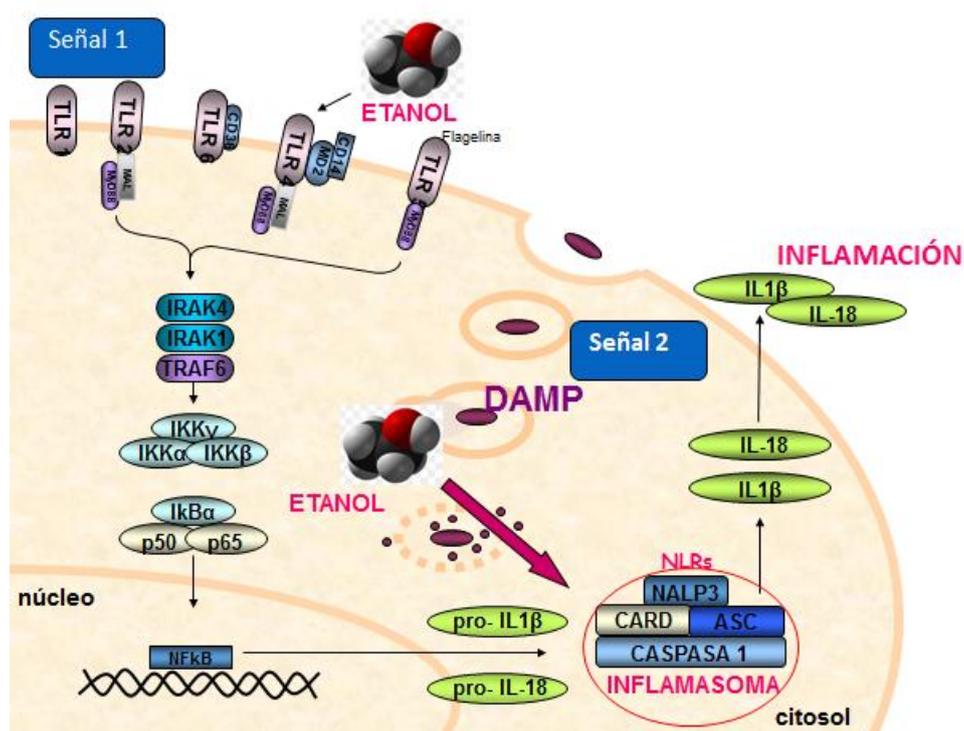


Figura 5. Papel de los receptores inmunes, TLR4 y NLRP3 en la neuroinflamación causada por el alcohol. Imagen modificada de *Franchi et al., 2012*.

1.4. EFECTOS DEL ALCOHOL EN LOS PROCESOS DE MIELINIZACIÓN.

La mielina es una extensión de la membrana plasmática de oligodendrocitos y células de Schwann ricas en colesterol, cuya función es servir de vaina aislante especializada para los axones de las neuronas del sistema nervioso. La mielina facilita la transmisión de la señal a través del axón mediante una conducción "a saltos" (Miron y Franklin, 2014). Sin embargo, la importancia de la mielina en el SNC va más allá de su papel en la conducción rápida de la señal,

ya que su perturbación puede causar disfunciones severas. Las perturbaciones de la estructura de la mielina y su función, también llamadas desmielinización, están asociadas con una larga lista de patologías del SNC, desde desórdenes congénitos y autoinmunes a perturbaciones metabólicas (Love, 2006).

La desmielinización progresiva resulta en último lugar, en una degeneración axonal debido a la disrupción de la señalización entre axones y oligodendrocitos. Se requiere una interacción entre axones y oligodendrocitos para mantener las correctas funciones metabólicas de los axones, el soporte trófico, la reorganización del citoesqueleto y el transporte en el axón (Edgar et al., 2004; Devaux y Scherer, 2005; Kassmann y Nave, 2008; Nave y Trapp, 2008; Bruce et al., 2010; Nave, 2010; Fünfschilling et al., 2012).

La sustancia blanca (mielina) es especialmente susceptible a la toxicidad del alcohol en el SNC (Buhler y Mann, 2011; Charness, 1993; Suzanne, 1988; Konrad et al., 2012; Norman et al., 2009). Asimismo, la pérdida estructural producida por la degradación de la mielina a causa de la ingesta de etanol, es parcialmente reversible tras un período de abstinencia (Cardenas et al., 2007). Se ha podido comprobar que el tratamiento crónico con etanol regula negativamente diversas proteínas involucradas en la mielinización como son la proteína proteolipídica (PLP), la proteína básica de la mielina (MBP) y la glicoproteína asociada a mielina (MAG) (Alfonso-Loeches et al., 2012), alteraciones también observadas en adolescentes con consumo intermitente de alcohol (Pascual et al., 2015). La Figura 6 muestra cómo la vaina de mielina se ve severamente afectada por un consumo crónico de alcohol.

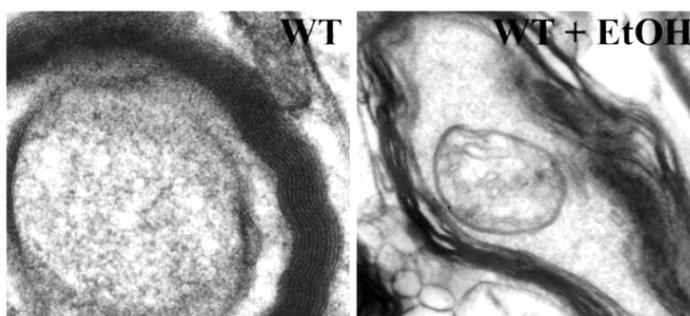


Figura 6. Vaina de mielina en un ratón sano (Izquierda) y con consumo crónico de alcohol (derecha). Imagen obtenida de Alfonso-Loeches et al., 2012.

En las células en las que se ha producido la desmielinización, la resistencia de la membrana ha disminuido considerablemente. Además, se produce una reducción importante de la velocidad con la que se trasmite la señal nerviosa, por tanto, afecta a la plasticidad sináptica. Asimismo, debido a que la mielina bloquea canales iónicos dependientes de voltaje, al desaparecer ésta, se activan consumiendo energía celular que antes se podía reservar para otros procesos (Pfefferbaum et al., 2010). Finalmente, existen diversos estudios donde se describe que, el nivel de afectación en la degradación de las vainas de mielina es más significativo en mujeres que en hombres (Alfonso-Loeches et al., 2013; Caldwell et al., 2005; Schweinsburg et al., 2003).

1.5. CAMBIOS EPIGENÉTICOS DEBIDOS A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL.

Durante las últimas décadas, se han identificado algunos genes que se asocian con consumo/abuso de alcohol y también se ha tratado de discernir si el abuso de alcohol en ciertos adolescentes se asocia con algún componente genético. Actualmente, no se han identificado genes que predispongan al inicio de consumo de alcohol y su abuso, aunque se ha sugerido que ciertos componentes en la personalidad, como carácter antisocial, ansioso, impulsivo, así como ciertas diferencias neurobiológicas, podrían predisponer al inicio del

consumo y abuso de alcohol durante la adolescencia (Meyers et al., 2010; Whelan et al., 2014). Pese a ello, hay estudios que han demostrado la capacidad que tiene el alcohol para inducir modificaciones epigenéticas. Específicamente, los cambios epigenéticos modifican la estructura de la cromatina, en regiones promotoras específicas, produciendo cambios en la expresión génica (Liu et al., 2006). Existen diversos mecanismos de modificación epigenética, tanto en histonas como fuera de ellas, como son; la acetilación, la metilación, la ubiquitinación, la sumoilación y la fosforilación. No obstante, las modificaciones de histonas más estudiadas debidas al consumo de alcohol son la acetilación y la metilación. Además, se ha descrito que los mecanismos epigenéticos suelen causar efectos reversibles en su mayoría (Holliday, 2006).

El alcohol induce numerosos cambios epigenéticos, principalmente afecta a la metilación y acetilación de los promotores de ciertos genes, afectando su expresión y participando en numerosos procesos (Pascual et al., 2012; Zou y Crews, 2014; Pandey et al., 2015). Algunos de estos genes son los relacionados con el desarrollo neural, los factores de crecimiento y la regulación del ciclo celular. Estas alteraciones epigenéticas pueden tener un impacto negativo severo en el sistema nervioso (Zhou et al., 2011). Se ha visto que se produce un incremento en la actividad del enzima ADN metiltransferasa (DNMT) con la exposición al alcohol. Este aumento de actividad puede persistir, incluso días, tras la última ingesta de alcohol. Aunque no se han observado alteraciones en la actividad de la histona deacetilasa (HDAC), se ha especulado que esta actividad disminuye. De hecho, DNMT y HDAC son parcialmente responsables de la regulación de los niveles de transcripción en ciertas regiones de la secuencia del ADN (Perkins et al., 2013). Asimismo, se ha visto que la acetilación de histonas por la histona acetil transferasa (HAT) está involucrada en los efectos cognitivos, tanto a corto como a largo plazo, asociados con la neuroinflamación.

Estas modificaciones epigenéticas, participan en la modulación de la expresión de genes de inflamación a través de los TLRs (Foster et al., 2007). Además, se conoce que la acetilación participa en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas a largo plazo (Gräff y Mansuy, 2009) y en comportamientos de adicción (Renthal y Nestler, 2008). Por tanto, es posible pensar en tratamientos que revertan la acetilación de histonas en los promotores de ciertos genes, con el fin de revertir la motivación del consumo de alcohol (Jeanblanc et al., 2015). En la Figura 7, se aprecia cómo las histonas se ven modificadas epigenéticamente a causa del consumo de alcohol, donde podemos observar los procesos de metilación, acetilación y fosforilación.

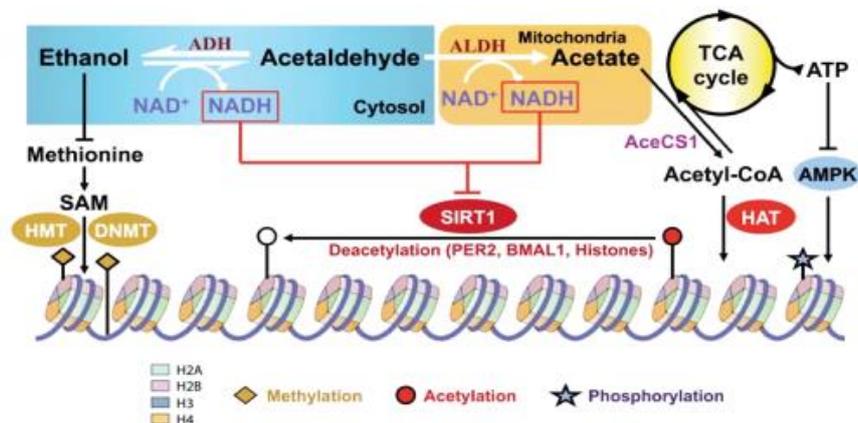


Figura 7. Modificaciones epigenéticas tras la ingesta de alcohol. Imagen tomada de Zakhari, 2013.

2. OBJETIVOS

Estudios epidemiológicos, clínicos y básicos demuestran que el consumo de alcohol en épocas cruciales para el desarrollo del Sistema Nervioso Central (SNC) supone un factor de vulnerabilidad para padecer trastornos psiquiátricos, en particular, trastornos por uso de sustancias que presentan en especial, una predisposición a un uso o abuso del alcohol, además de causar disfunciones cognitivas (Baer et al., 2003; Kelly et al., 2009; Guerri et al., 2009). Sin embargo, los mecanismos neurobiológicos que subyacen a esta vulnerabilidad adquirida no están totalmente esclarecidos, viéndose involucrados otros procesos tales como la neurodegeneración, inflamación y posibles cambios epigenéticos (Blanco et al., 2005; Alfonso-Loeches et al., 2010; Pascual et al., 2012; Fernández-Lizarbe et al., 2013). Además, es necesario conocer con precisión cuáles son exactamente los períodos críticos en el desarrollo del individuo y si existen diferencias asociadas al sexo en estos procesos (Alfonso-Loeches et al., 2013).

Para abordar este problema, se ha planteado el siguiente estudio: ***“Evaluar los efectos de la exposición prenatal al etanol y/o adolescencia tardía en el desarrollo cerebral y las consecuencias neurológicas en el individuo adulto”***

Para el desarrollo de esta hipótesis de partida, mediante el uso de distintas técnicas de biología celular y molecular, se van a abordar 4 objetivos principales:

Determinar si el consumo de alcohol en distintos estadios del desarrollo, tanto prenatal (EW), adolescente (WE) o ambas etapas (EE) afecta en el adulto:

- 1- Observar la expresión de los receptores del sistema inmune *Toll like* (ej. TLR4 y TLR2) y *NOD like* (NLRP3) y sus rutas de señalización.
- 2- Estudiar los marcadores de neuroinflamación y daño neural en las muestras obtenidas, mediante la medida de los niveles de expresión de mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2), citocinas proinflamatorias (IL-1 β) y otras proteínas relacionadas con los procesos de gliosis y daño cerebral (GFAP, Neu N y Caspasa-3).
- 3- Evaluar si existen cambios en los procesos de mielinización mediante el estudio de la expresión de proteínas asociadas a la mielina.
- 4- Investigar los posibles cambios epigenéticos mediante el estudio de acetilación y metilación de histonas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, se usaron 32 ratones silvestres *wild type* (WT) de la cepa C57BL/6 (Harlan Ibérica S.L., Barcelona) cedidos por el laboratorio de la Dra. Olga Valverde de la Universidad Pompeu Fabra (Barcelona). Todos los animales se criaron y mantuvieron en condiciones SPF (zona barrera libre de gérmenes patógenos) con seguridad biológica y ciclos de luz/oscuridad (12/12h) controlados, temperatura ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), y humedad (60%). Las hembras fueron dispuestas en cajas independientes durante el período de gestación con el fin de evitar períodos de estrés que pudiesen afectar a los resultados obtenidos. Los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados siguiendo las pautas establecidas por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea (86/609/ECC), por Real Decreto Ley 1201/2005.

3.2. ADMINISTRACIÓN DE ETANOL A ANIMALES.

Las madres fueron expuestas a una solución de etanol (20%) durante las tres semanas de gestación. El protocolo que utilizamos para el consumo de alcohol prenatal, fue en forma de "atracción" utilizando el procedimiento del "*DID test*" ("*Drinking in the dark*" test) durante las tres semanas de gestación. De este modo, el consumo de la solución de etanol al 20% (diluído en agua) durante la gestación, se realizó durante cuatro días a la semana por un período de tres semanas. Durante los tres primeros días de cada semana, las madres fueron expuestas a etanol durante 2 horas, aunque el cuarto día de cada semana se las expuso a etanol durante 4 horas para producir el "*binge*". Durante el ensayo, se mantuvo un grupo control siguiendo el mismo procedimiento, pero con ingesta de agua en lugar de alcohol. Para la realización del protocolo experimental, todos los animales estuvieron bajo un ciclo de luz invertido. Los animales recibían agua y comida "*ad libitum*" en los períodos en los que no estaban expuestos al procedimiento del *DID test*. Tras el parto, las madres dejaron de recibir alcohol, con lo cual, no se les administró alcohol durante el período de lactancia.

Los animales fueron destetados el PND21. A partir de ahí, se separaron machos y hembras, seleccionando sólo los machos para continuar con los experimentos. Cuando los hijos machos llegaron al período de adolescencia, fueron expuestos al protocolo de consumo de etanol en atracción (*DID test*) durante 2 semanas.

El ensayo usando el *DID test* se realizó comenzando el día postnatal PND47-53 y por tanto finalizando entre los días PND57-63 tras el nacimiento. Los animales se separaron en cuatro grupos de estudio, de modo que se usaron 8 animales por cada una de las 4 condiciones:

- 1) Grupo control: agua prenatal + agua adolescencia, designados **WW**
- 2) Consumo prenatal: etanol prenatal + agua adolescencia, designados **EW**
- 3) Consumo adolescente: agua prenatal + etanol adolescencia, designados **WE**
- 4) Consumo ambas etapas: etanol prenatal + etanol adolescencia, designados **EE**

3.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN PROTEICA.

De los cerebros de cada uno de nuestros animales experimentales, se diseccionaron dos áreas: corteza prefrontal e hipocampo. Para la obtención de la proteína total, el tejido (250mg de tejido/0.5 ml tampón de lisis) se homogeneizó en tampón de lisis frío (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl pH8, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄ y 1 mM PMSF). Los extractos homogeneizados se mantuvieron en hielo

durante 30 minutos, se centrifugaron a máxima velocidad (13000 rpm) durante 15 minutos, y el sobrenadante se recolectó para determinar la concentración proteica. Asimismo, para determinar proteínas nucleares, se llevó a cabo el aislamiento de extractos nucleares para cada una de las áreas cerebrales de estudio, usando el kit comercial “*Epiquik Nuclear Extraction*”, siguiendo las indicaciones comerciales (Epigentek, Farmingdale, NY). La concentración proteica de los lisados, se midió usando el kit de BCA (ácido bicinonónico) de la casa comercial Pierce (Thermo Fisher Scientific, España).

3.4. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La inmunoelectrotransferencia se usó para determinar los niveles de expresión de proteínas de interés para el presente estudio (ver Tabla 1). Para ello se utilizaron geles de 1.5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 6 y el 15% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver y adicionando dodecil-sulfato sódico (SDS). Se mantuvo una relación acrilamida: bis-acrilamida de 30: 0,8 en todos los casos. A las muestras obtenidas se les añadió tampón de carga 6X (350mM Tris pH 6.8, 30% glicerol, 30% mercaptoetanol, 100g/L SDS, 200 mg/L azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min. Para la electroforesis se utilizó un sistema Mini Protean de Bio-Rad en tampón: 6g/L de Trizma base, 2.88g/L de glicina y 20g/L de SDS.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilion Transfer Membrane, Millipore) en tampón 3g/L de Trizma base, 1.44 g/L de glicina y un 20% de metanol, durante 1h a 100V.

Las membranas se bloquearon durante 60 min en Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.1% (Tris 20mM y NaCl 500mM pH 7.5) y se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación, con los correspondientes anticuerpos primarios (Tabla 1). Tras la incubación, las membranas se lavaron 3-4 veces con TBS-T 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios (Tabla 2) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia usando ECL-Plus (Amersham) y se expusieron a *films* o películas *MXG* de Kodak o *Hyperfilm* (alta afinidad) de Amersham.

Otras membranas fueron reveladas usando el método de fosfatasa alcalina, que consiste en una mezcla de BCIP/NBT (1:2) diluída en un tampón de fosfatasa alcalina (Tris 12.1 g/L, MgCl₂ 1.01 g/L, NaCl 5.8 g/L pH 9.2) que es transformada por acción de la enzima fosfatasa en un precipitado con coloración. En algunos casos, las membranas reveladas por quimioluminiscencia, fueron reincubadas nuevamente con otros anticuerpos. Para ello, antes del bloqueo, las membranas se trataron con 200mM de glicina pH 2.5 y 0.4% SDS, durante 1 h a temperatura ambiente.

Se utilizaron diversos anticuerpos como control de carga: GAPDH en la gran mayoría, Vinculina para proteínas de alto peso molecular y Lámina A/C e Histona 3 total para proteínas nucleares (ver Tabla 1).

Tabla 1. Listado de los anticuerpos primarios utilizados.

Anticuerpo	Descripción	Organismo	Dilución	Casa Comercial
TLR4	<i>Receptor tipo toll 4</i>	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
TLR2	<i>Receptor tipo toll 2</i>	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology

NF-κB p65	<i>Factor nuclear NF-Kappa-B subunidad p65 (también conocido como RelA)</i>	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology
NRLP3	<i>Receptor tipo NOD, Dominio de pirina que contiene la proteína 3 (también conocida como CIAS1 o Criopirina)</i>	Conejo	1:1000	Abcam
Caspasa-1	<i>Cisteína Peptidasa 1 relacionada con la apoptosis</i>	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
Caspasa-3	<i>Cisteína-aspártico proteasa ácida (caspasa)3</i>	Conejo	1:1000	Cell Signalling
iNOS	<i>Óxido nítrico sintasa</i>	Conejo	1:300	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	<i>Ciclooxigenasa-2</i>	Conejo	1:1000	Abcam
GFAP	<i>Proteína fibrilar gliar ácida</i>	Conejo	1:500	Sigma Aldrich
Neu-N	<i>Proteína nuclear específica de neuronas</i>	Ratón	1:200	Millipore
MYRF	<i>Factor regulador de mielina</i>	Conejo	1:1000	Millipore
MAG	<i>Glicoproteína asociada a mielina</i>	Conejo	1:5000	Abcam
MBP	<i>Proteína básica de mielina</i>	Rata	1:1000	Abcam
PLP	<i>Proteína proteolípida de mielina (también conocida como lipofilina)</i>	Conejo	1:1000	Abcam
H3K9ac	<i>Histona H3 Acetil-K9</i>	Conejo	1:1000	Cell signaling
H4K5ac	<i>Histona H4 Acetil-K5</i>	Conejo	1:10000	Abcam
H4K12ac	<i>Histona H4 Acetil-K12</i>	Conejo	1:1000	Cell signaling
K-Ac	<i>Acetil Lisina</i>	Conejo	1:1000	Abcam
H3K4me3	<i>Histona H3 (tri-metil k4)</i>	Conejo	1:1000	Abcam
H3 total	<i>Histona H3 Total</i>	Conejo	1:1000	Abcam
LMNA	<i>Lamin A/C</i>	Ratón	1:1000	Cell Signalling
VCL	<i>Vinculina, proteína de membrana-citoesqueleto en placas de adhesión focal</i>	Conejo	1:10000	Abcam
GAPDH	<i>Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (también conocido como G3PDH)</i>	Ratón	1:3000	Chemicon

Tabla 2. Listado de los anticuerpos secundarios utilizados.

Anticuerpos Secundarios	Concentración	Casa Comercial
HRP-IgG-Conejo	1:20000	Sigma-Aldrich
HRP-IgG-Ratón	1:5000	Sigma-Aldrich
HRP-IgG-Rata	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
PA-IgG-Conejo	1:1000	Sigma-Aldrich
PA-IgG-Ratón	1:1000	Sigma-Aldrich

3.5. DETECCIÓN DE LA CITOCINA *IL-1 β* MEDIANTE ELISA.

Las distintas muestras de corteza prefrontal e hipocampo se homogeneizaron en tampón de lisis frío (1% Nonidet P-40, 20 mM Tris-HCl pH8, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 10 mM DTT, 1 mM ortovanadato sódico (Na₃VO₄) y 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)) (250 mg tejido/0,5 ml). Las muestras lisadas se mantuvieron en hielo durante 30 minutos y se centrifugaron a máxima velocidad durante 15 min. El sobrenadante se recolectó para la determinación de los niveles de IL-1 β en estos lisados. La concentración de la citocina IL-1 β se determinó en las distintas muestras de estudio, mediante el uso del kit ELISA (Bender MedSystems GmbH, Austria) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.6. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD HISTONA ACETILTRANSFERASA (HAT) Y DE LA ACTIVIDAD HISTONA DEACETILASA (HDAC).

La actividad de la histona acetiltransferasa (HAT) y la histona deacetilasa (HDAC) fue medida utilizando distintos kits de ensayo, el “EpiQuik™ HAT Activity/Inhibitor Assay Kit” (P-4003, Epigentek), y el “Epigenase HDAC Activity/Inhibition Direct Assay Kit” (P-4034, Epigentek), respectivamente. En estos kits, las placas que venían incluidas contenían sus respectivos sustratos cubriendo de manera estable cada pocillo de la placa. Las muestras de los extractos nucleares tanto de corteza prefrontal e hipocampo se añadieron para catalizar la reacción intencionada. Los productos se detectaron en una reacción de ELISA utilizando anticuerpos específicos, según se indicaba en las instrucciones del fabricante. Los cambios en la actividad de las enzimas se expresaron en las siguientes unidades [ng/h/mg de proteína] y se analizaron las diferencias respecto al grupo control.

3.7. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los resultados se muestran como [media \pm error estándar de la media (SEM)]. Para el análisis estadístico, se utilizó el programa SPSS versión 17.0. Las diferencias significativas de los resultados se analizaron mediante el uso de un test no paramétrico, el Test de la U-Mann-Whitney comprobando la normalidad por el Test de Z Kolmogorov-Smirnov, o bien, siguiendo una Prueba T-Student.

Las diferencias en el p-valor < 0.05, fueron consideradas estadísticamente significativas. El programa GraphPad (versión 3) se utilizó para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop (versión 7.0) para el procesamiento de las imágenes y Figuras.

4. RESULTADOS

4.1. ACTIVACIÓN DE LOS RECEPTORES INMUNES EN EL ADULTO TRAS UNA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4/NLRP3 Y LA NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA.

Los receptores tipo Toll (TLRs) han sido descritos con anterioridad como receptores altamente importantes en la respuesta innata inmune al consumo de alcohol, específicamente los receptores TLR4 y TLR2 (Alfonso-Loeches et al., 2010; Fernández-Lizarbe et al., 2013). De hecho, se ha demostrado que el TLR4 es endocitado a través de unos microdominios de membrana “*lipid rafts*” (Blanco et al., 2007), activándose en las células gliales del SNC tras la ingesta de alcohol, donde se desencadena una respuesta neuroinflamatoria mediante la activación de la cascada de señalización de TLR4, liberándose mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2), especies reactivas de oxígeno (ROS) y citocinas proinflamatorias que causan neuroinflamación y daño neural.

4.1.1. Activación de TLR4/TLR2 y su cascada de señalización.

En este trabajo, mediante el uso de muestras de corteza prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) pertenecientes a cada uno de los 4 grupos de animales estudiados (ver *Material y Métodos*), se han determinado mediante inmunoelectrotransferencia los niveles de expresión de los receptores inmunes TLR4, TLR2 y la activación de su cascada de señalización mediante la translocación al núcleo del factor de transcripción NFκB/p65.

Según se muestra en la Figura 8, los niveles de ambos receptores inmunes, TLR4 y TLR2, aumentaban de manera notable en los ratones expuestos al etanol durante la gestación o en animales que habían consumido alcohol durante la adolescencia. Concretamente, el receptor TLR4, presenta un aumento significativo en la CPF de los distintos casos de estudio, tanto en los animales que habían estado expuestos al alcohol en etapa prenatal (EW), o durante el período de adolescencia (WE) o bien, durante ambas etapas (prenatal y adolescente (EE)), y comparando con los controles no tratados que sólo han consumido agua (WW). Sin embargo, en el HIP, observamos que el TLR4 tiende a aumentar tras una exposición prenatal (EW), que no llega a ser significativa, aunque en etapas de consumo de alcohol durante la adolescencia (WE) o en ambas etapas (prenatal + adolescente), sí observamos un incremento significativo del receptor TLR4.

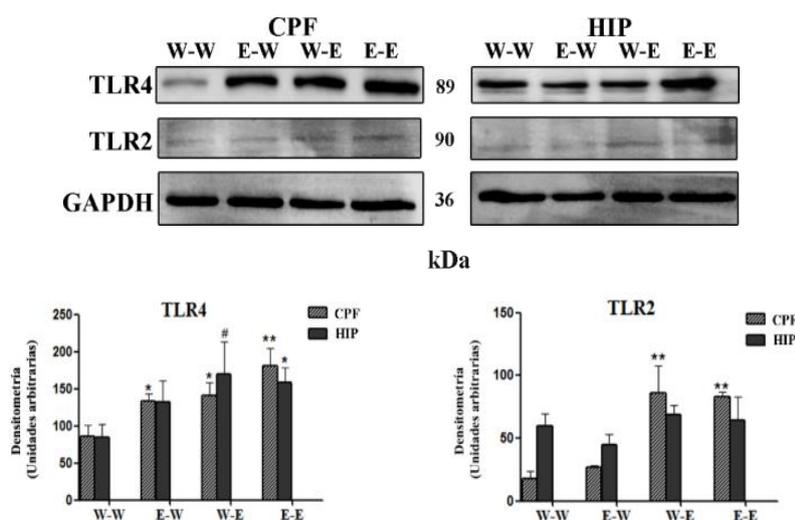


Figura 8: Cambios en la expresión de los niveles de receptores inmunes TLR4 y TLR2 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. #p-valor<0.1, *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 (Test T Student).

En cuanto a los niveles de TLR2 (Fig. 8) en el CPF experimentan una crecida importante en WE y en los animales expuestos a alcohol en ambos períodos (EE), siendo en ambos casos muy significativo su incremento. Sin embargo, en los que habían estado expuestos al alcohol en la etapa prenatal (EW), se observa una tendencia positiva que no llega a ser significativa. En el caso del HIP, no se observaron diferencias significativas en los niveles de TLR2 en ninguno de los casos de estudio y en comparación con los controles.

4.1.2. Activación y translocación al núcleo de NFκB/p65 y producción de mediadores inflamatorios, iNOS y COX-2.

El factor nuclear *kappa* B (NFκB) es uno de los factores celulares de transcripción primarios, implicado en el control y regulación de la expresión de distintos genes (Ghosh y Dass, 2016). Este factor presenta una función principal en las respuestas inflamatoria e inmune, respondiendo al estrés como puede ser la ingesta de una elevada cantidad de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2010).

Una vez el alcohol atraviesa la barrera hematoencefálica y se activan los receptores TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2016) que desencadenan la activación de la vía de señalización que termina con la translocación de NFκB/p65, se liberan mediadores inflamatorios, como iNOS y COX-2, además de citocinas proinflamatorias que causan neuroinflamación e incluso daño cerebral (Alfonso-Loeches et al., 2010).

De este modo, en primer lugar, se midieron los niveles de NFκB/p65 en los extractos nucleares obtenidos de las muestras de estudio mediante inmunoelectrotransferencia, observándose si se había producido o no su translocación al núcleo, y por tanto la activación de la cascada neuroinflamatoria asociada a TLR4. Como podemos observar en la Figura 9, se observa un incremento en la translocación del NFκB/p65 al núcleo, tanto en CPF como en HIP, que además es significativo según muestra la cuantificación, para cada uno de los casos de estudio, tanto en EW (prenatal), como EW (adolescente) o por consumo de alcohol en ambas etapas (EE), comparando con sus controles no tratados (WW).

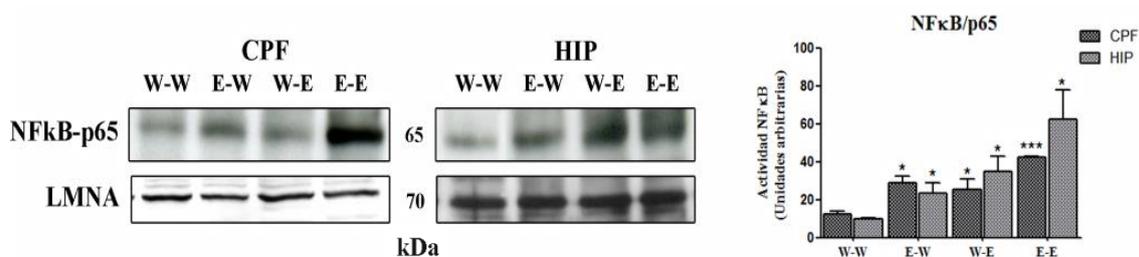


Figura 9: Translocación al núcleo del factor de transcripción NFκB/p65 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. *p-valor<0.05, ***p-valor<0.001 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

Asimismo, se midieron los niveles de expresión de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 mediante inmunoelectrotransferencia, para confirmar si tras una exposición temprana al alcohol, se mantenían los niveles de neuroinflamación en el individuo adulto.

En la Figura 10, se aprecia un claro incremento de la liberación de estos mediadores inflamatorios tanto en CPF como en hipocampo, que es significativo para todas las etapas del desarrollo estudiadas (EW, WE y EE) en ambas áreas.

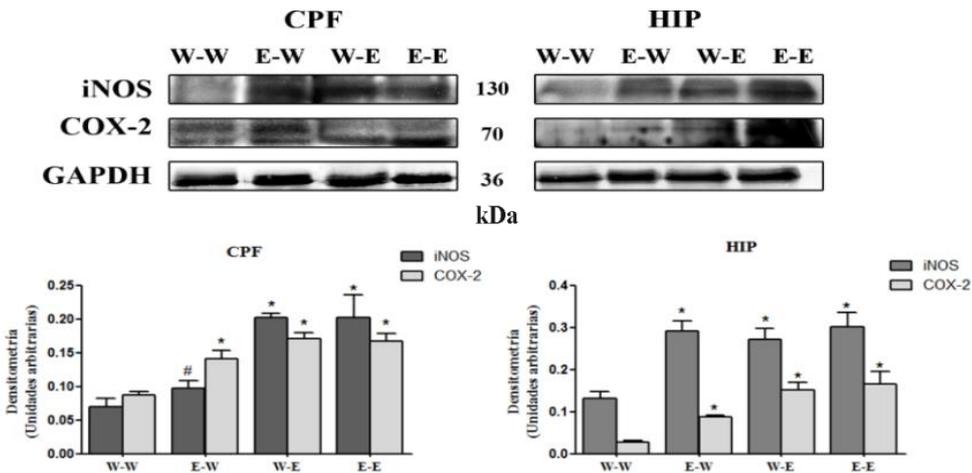


Figura 10: Liberación de mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. #p-valor<0.1, *p-valor<0.05, (Test T Student).

4.1.3. Activación del inflamasoma NLRP3/Caspasa-1.

Otros receptores de interés fueron los receptores tipo NOD (NLRs) que se ha demostrado que interactúan con los TLRs formando parte de una cascada de señalización asociada a procesos neuroinflamatorios (Glass et al., 2010; Bauernfeind et al., 2009; Becker y O'Neill, 2007).

Los NLRs son complejos multiproteicos conocidos como inflamasomas, donde el más conocido es el NLRP3 que se ha visto que participa en la neuroinflamación de la respuesta inmunológica desencadenada por el consumo de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2014; 2016).

Para que se produzca la activación del inflamasoma NLRP3, existen diversos componentes que deben actuar coordinadamente para llevar a cabo la respuesta (Sutterwala et al., 2006), de entre ellos, la cisteína proteasa Caspasa-1 tiene un papel esencial, puesto que su activación promueve el procesamiento proteolítico de citocinas proinflamatorias fundamentales a sus formas biológicamente activas (p.ej. IL1 β e IL-18). De hecho, se ha demostrado que la activación de TLR4 y producción de pro-IL1 actuaría como primera señal preestimuladora o "priming", que junto con una segunda señal (p.ej. ROS mitocondrial) daría lugar al ensamblaje del inflamasoma NLRP3, promoviendo su reclutamiento y activación (Alfonso-Loeches et al., 2014).

En la Figura 11, podemos observar mediante inmunoelectrotransferencia los niveles tanto de NLRP3 como de Caspasa-1. Los resultados obtenidos, muestran que los niveles de NLRP3 aumentan en CPF de manera significativa en todas las condiciones con respecto al control, especialmente en la exposición al etanol durante la etapa fetal (EW) y durante el consumo en ambas etapas (EE), comparando con los controles no tratados (WW). Referente al HIP, se observa un incremento claro de la expresión del inflamasoma NLRP3 en EW y EE, no observándose cambios apreciables durante el consumo de alcohol durante la etapa EW, comparando con los animales controles, WW.

En cuanto a los niveles de activación de Caspasa-1, concretamente la Caspasa-1/p10, péptido bioactivo, se demuestra que existe un aumento significativo en todos los casos de exposición temprana al alcohol durante el desarrollo (EW, WE, EE) tanto en CPF como en HIP, aunque en el caso del consumo en etapa prenatal (EW) los cambios observados son menos significativos, al igual que ocurría en el HIP con la expresión de NLRP3. Los datos muestran una correlación positiva con los niveles del inflamasoma NLRP3 y del fragmento activo p10 de Caspasa-1.

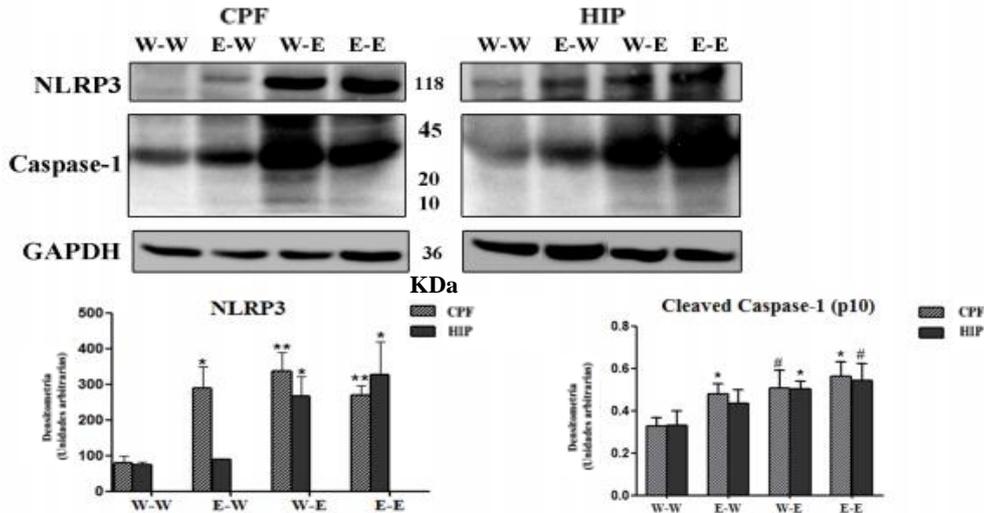


Figura 11: Niveles de NLRP3 y Caspasa-1/p10 en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. # p-valor<0.1, *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

4.1.4. Activación y liberación de “IL-1 β ” asociada a procesos de neuroinflamación.

Diferentes estudios han descrito que los inflamasomas dependientes de Caspasa-1, como es el caso de NLRP3, desencadenan un tipo de muerte celular programada conocida como piroptosis (tipo de muerte similar a la necrosis) que se asocia a procesos de inflamación y se liberan al espacio citoplasmático, citocinas entre las que destaca interleucina 1-beta (β) o IL-1 β (Miao et al., 2011). Por tanto, la presencia de IL-1 β es un indicador de daño celular, que indica una activación neuroinflamatoria, desde la percepción en los receptores TLRs y NLRs hasta la activación de genes asociados a inflamación como la propia IL-1 β . Además, existen estudios que muestran que el alcohol puede inducir muerte celular programada, no sólo por apoptosis sino también por piroptosis (Alfonso-Loeches et al., 2014; 2016).

Con el fin de evaluar si la activación de la vía NLRP3 conllevaba la liberación de la citocina IL-1 β , en las distintas condiciones de consumo de alcohol durante la ontogenia (EW, WE, y EE) a las que se han expuesto los animales, y teniendo en cuenta las dos áreas de estudio, tanto CPF como HIP, se midió la expresión de la citocina IL-1 β mediante un ensayo ELISA (ver *Material y Métodos*). En la Figura 12, podemos observar un claro incremento significativo en la liberación de IL-1 β en la CPF en todas las condiciones experimentales estudiadas, tanto en etapa EW (prenatal), adolescente (WE) y en ambas etapas (EE), en comparación al control (WW). Sin embargo, en el caso de las muestras analizadas de HIP, podemos decir que existe una tendencia positiva al incremento de IL-1 β que, pese a no ser estadísticamente significativa, salvo en el consumo de alcohol en ambas etapas (EE), ha de ser tenida en cuenta.

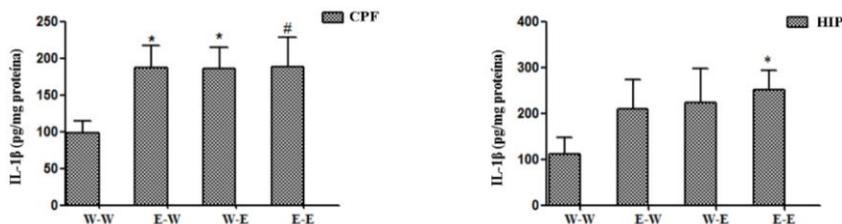


Figura 12: Variación de los niveles de la citocina proinflamatoria IL-1 β (pg/mg proteína) en el CPF e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. #p-valor<0.1, *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 (Test T Student).

4.2. ALTERACIONES DE MIELINA MANTENIDAS EN EL ADULTO TRAS UNA EXPOSICIÓN TEMPRANA AL ALCOHOL EN PERÍODOS CRÍTICOS DEL DESARROLLO.

Numerosos trabajos en humanos y en animales experimentales, han demostrado que el abuso de alcohol causa desmielinización y alteraciones en las vainas de mielina (Pfferbaum et al., 2010). Además, las últimas evidencias, sugieren que muchas enfermedades neurodegenerativas se encuentran asociadas a procesos de neuroinflamación y desmielinización (Felts et al., 2005; Marta et al., 2009; Sloane et al., 2010). Asimismo, se ha podido comprobar que la activación de los receptores TLR4, posee un papel fundamental en la desmielinización asociada a un consumo de alcohol crónico (Alfonso-Loeches et al., 2012), y también en adolescentes con tratamiento intermitente de alcohol (Pascual et al., 2014).

Con el fin de comprobar si la exposición al alcohol en etapas tempranas era capaz de alterar y/o mantener alteraciones que pudieran afectar a los procesos de mielinización en el adulto, se midieron mediante inmunoelectrotransferencia en extractos de proteína total, los niveles de diversas proteínas que participan en el proceso de formación de la mielina tanto en el hipocampo (HIP) como en el córtex prefrontal (CPF). Las proteínas que se estudiaron fueron la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), la proteína básica de mielina (MBP), la proteína proteolípídica (PLP) y el factor regulador de la mielina (MYRF). Las primeras tres proteínas, son las principales encargadas del proceso de mielinización, mientras que MYRF es un factor de transcripción que regula la expresión genética de las otras tres, por tanto, los niveles de estas proteínas deberían variar de manera coordinada.

En la Figura 13 se puede apreciar que la expresión de MYRF en la CPF disminuye notablemente en todos los casos de exposición al alcohol durante etapas tempranas del desarrollo (EW, WE y EE) con respecto al control no tratado (WW), mostrando un claro proceso de desmielinización en consecuencia. No obstante, al observar la expresión de estas proteínas en HIP, no se muestran cambios significativos en la expresión de MYRF, que se mantiene estable.

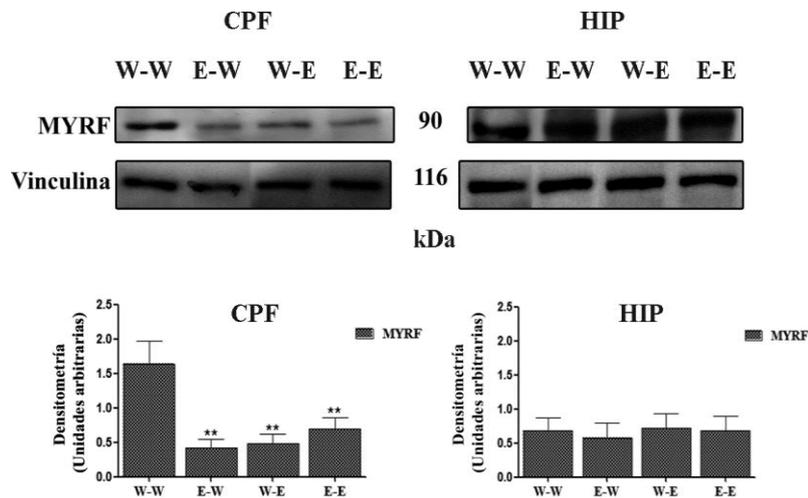


Figura 13: Niveles de expresión del factor de transcripción MYRF en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Se midieron los niveles de MYRF en cada uno de los casos de estudio y como control de carga se presenta Vinculina. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. **p-valor<0.01 (Test T Student).

En cuanto a las proteínas que intervienen en la formación de mielina, aunque se aprecia un descenso global en conjunto para el CPF (ver Fig. 14), no presentan un mismo comportamiento. Así, mientras que los niveles de MAG se mantienen estables en los períodos de consumo durante WE y EE, la exposición prenatal al etanol (EW), causa una disminución

que resulta ser muy significativa. Respecto a los niveles de expresión de MBP, observamos que tiene una clara tendencia a disminuir su expresión tanto en la etapa prenatal (EW), y más significativamente en adolescentes (WE), aunque parece que no se ve afectada en los dobles expuestos (EE). Por último, la proteína PLP disminuye significativamente en las etapas EW y EE, aunque en WE se mantienen los niveles estables. En definitiva, se podría decir que estos resultados correlacionan con los obtenidos para el factor regulador MYRF (ver Fig. 13) en su conjunto.

Asimismo, en la Figura 14, se midieron los niveles de estas proteínas implicadas en mielinización en el HIP. En esta región cerebral se observa una disminución en los niveles de MAG y PLP, sobre todo en etapas de exposición o consumo de alcohol, EW y EE, respectivamente. Sin embargo, en el consumo de alcohol durante el período de adolescencia tardía (WE), no se observan cambios significativos salvo en la proteína MAG que disminuye significativamente. También es remarcable que la MBP muestra una ligera tendencia a disminuir en la etapa EW, pero en general se ve bastante estable, lo que correlacionaría con los niveles observados de MYRF (Fig.13).

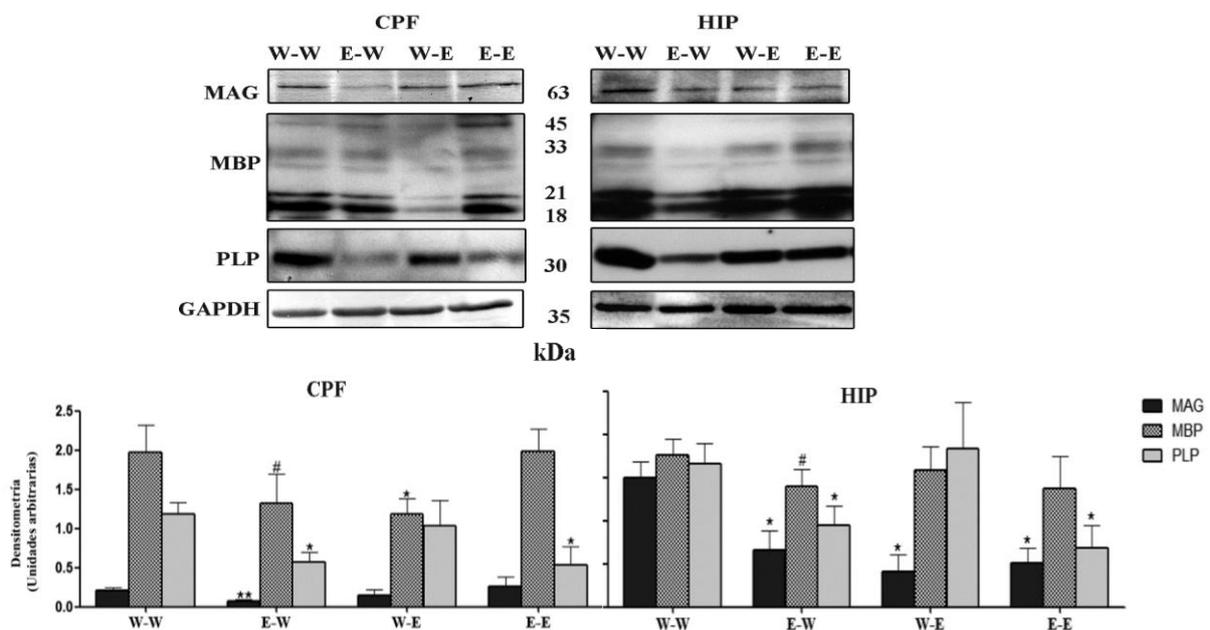


Figura 14: Alteraciones en las proteínas implicadas en procesos de mielinización en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Se midieron los niveles de MAG (proteína asociada a la mielina), MBP (proteína básica de la mielina) y PLP (proteína proteolipídica) en los distintos casos. Como control de carga se presenta GAPDH. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. # p-valor < 0.1, *p-valor < 0.05, **p-valor < 0.01 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

Los resultados obtenidos parecen indicar que existe una correlación entre la activación de los receptores inmunes TLR4/NLRP3 y sus cascadas neuroinflamatorias, con una disminución de la expresión de las proteínas relacionadas con la producción de mielina, demostrándose así que el TLR4 es un factor clave en los procesos de mielinización tras un consumo de alcohol durante la ontogenia temprana, manteniéndose estos cambios importantes en el individuo adulto.

4.3. CAMBIOS EPIGENÉTICOS DEBIDOS A LA EXPOSICIÓN TEMPRANA AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.

La acetilación de histonas es un proceso importante que controla la expresión genética y que participa en los procesos de aprendizaje y memoria, los cuáles se ven afectados en muchas

enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Gräff y Mansuy, 2009; Gräff et al., 2012). Al mismo tiempo, la adicción al alcohol y su consumo está asociado con cambios epigenéticos en la acetilación de histonas (Pascual et al., 2012).

Por ello, quisimos evaluar si la exposición al alcohol durante la etapa fetal (EW) o durante la adolescencia tardía (WE) o en ambas (EE), había producido cambios epigenéticos en el CPF o en el HIP y si estos cambios se mantenían en la edad adulta. De este modo, se testaron mediante ensayos de actividad los niveles de la histona acetilasa (HAT) y de la histona deacetilasa (HDAC), según se indica en el apartado de *Material y Métodos*. Los resultados de las actividades en la Figura 15, mostraron una clara tendencia significativa a aumentar las acetilaciones puesto que se observa una notable disminución de la actividad deacetilasa (HDAC) en CPF, mientras que en la actividad HAT no observamos variaciones significativas.

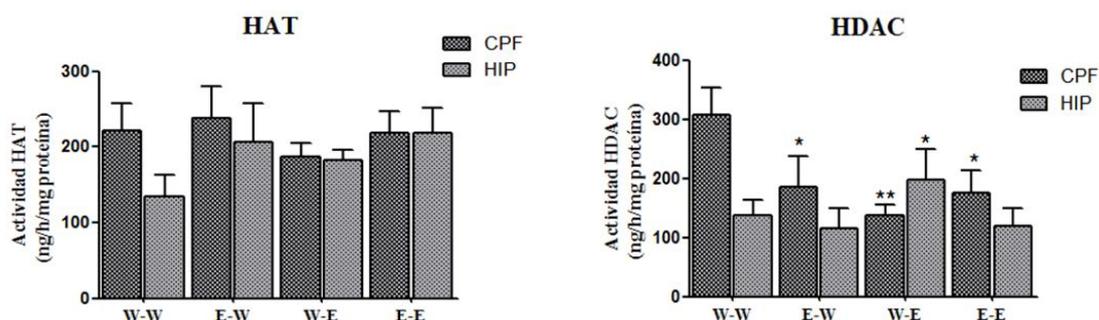


Figura 15: Niveles de actividad de histona deacetilasa (HDAC) e histona acetilasa (HAT) en la corteza prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. *p-valor<0.05, **p-valor<0.01 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

En cuanto al HIP, no se pudieron apreciar diferencias significativas en los animales que habían sido expuestos a un consumo de alcohol en etapa EW y/o EE, aunque existe un aumento significativo en la actividad HDAC en el caso de la exposición en etapa WE, cuando comparas con los controles no tratados (WW) junto con una clara tendencia positiva que aumenta la actividad HAT, aunque no llega a ser significativo (Fig.15).

Asimismo, en la Figura 16, para ver en qué lugar de las histonas se producía el cambio exactamente, se testaron tres lugares potenciales de acetilación mediante inmunoelectrotransferencia de los extractos nucleares de CPF e HIP. Los aminoácidos observados fueron las lisinas 5 (K5) y 12 (K12) de la histona H4, y la lisina 9 (K9) de la histona H3.

En el CPF (Fig. 16A) observamos una clara tendencia al aumento en las diferentes etapas de exposición al alcohol (EW, WE y EE) de las histonas acetiladas (H3K9ac, H4K5ac Y H4K12ac), aumento significativo que correlaciona perfectamente con los datos obtenidos en las actividades. En las muestras de HIP (Fig. 16B), también existe cierta tendencia al aumento de las acetilaciones en las etapas EW y EE. No obstante, se aprecia una disminución de acetilación en los adolescentes tardíos (WE), comparando con los animales control no tratados (WW).

Además, también analizamos los niveles de la acetil-lisina (K-ac) que es la enzima que se encarga de acetilar los residuos de lisina en diferentes proteínas diana, en este caso, las histonas. Estas enzimas funcionan de manera que transfieren un grupo acetilo del acetil-CoA a la lisina susceptible de ser acetilada y, por lo tanto, su expresión debería ir acorde con la acetilación de las diferentes lisinas de las histonas testadas.

Los resultados obtenidos muestran que los niveles de K-ac, tienden a incrementar en CPF (Fig. 16A), presentando un aumento con tendencia significativa (p -valor <0.1) en todos los casos de la exposición al alcohol durante el desarrollo (EW, WE y EE), comparando con los animales control (WW), lo que correlaciona positivamente con los resultados obtenidos de las actividades HAT y HDAC (Fig.15). Sin embargo, en el HIP, K-ac sólo aumenta en la exposición durante la etapa EW, en concordancia con los datos obtenidos para los niveles de las lisinas acetiladas (ver Fig.16B).

Al mismo tiempo, quisimos también cuantificar otro tipo de alteración epigenética, como es la metilación de histonas. Concretamente, medimos los niveles de la trimetilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4me3), mediante ensayo de inmunoelectrotransferencia (ver Fig.16 A-B), la cual no presentó cambios notables en ninguno de los casos de exposición al alcohol durante la ontogenia temprana en el caso del CPF. Sin embargo, en el caso de exposición de alcohol en etapas EW y EE para el HIP, se vieron incrementados significativamente los niveles de la histona H3K4me3, en comparación con los controles no tratados (WW).

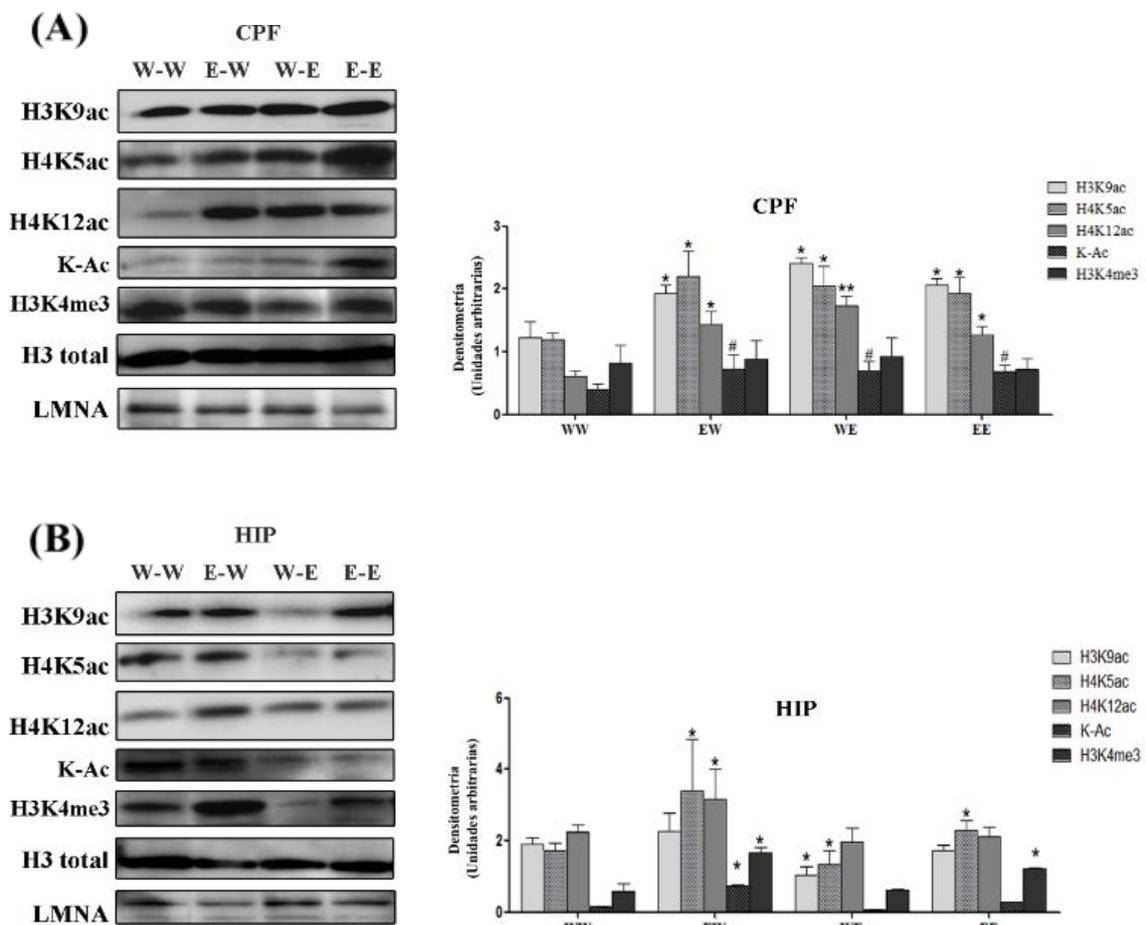


Figura 16: Cambios epigenéticos asociados con acetilaciones y metilaciones en el córtex prefrontal (CPF) e hipocampo (HIP) tras la exposición al alcohol durante el desarrollo. Se midieron los niveles de acetilaciones de la lisina 9 de la Histona 3 (H3K9), la lisina 5 y la 12 de la Histona 4 (H4K5 y H4K12, respectivamente), la acetilación de lisinas (K-Ac) y la trimetilación de la H3 en la lisina 4 (H3K4me3) en los distintos casos de estudio. Se presentan controles de carga de núcleos de la Histona H3 total y la Lámina A/C. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. $n=4$ /condición. # p -valor <0.1 , * p -valor <0.05 , ** p -valor <0.01 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

4.4. DAÑO CEREBRAL ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA TEMPRANA.

El alcohol es un componente neurotóxico, cuyo abuso causa neuroinflamación e incluso neurodegeneración (Alfonso-Loeches et al., 2010; Pascual et al., 2007; Harper y Matsumoto, 2005). En este sentido, se ha pretendido estudiar el daño cerebral que puede estar asociado a un consumo de alcohol durante la ontogenia temprana, con el fin de conocer en profundidad si los daños producidos por el abuso de alcohol en la etapa prenatal (EW), en la adolescencia tardía (WE) o incluso en ambas etapas (EE) son equiparables a los daños ya conocidos que se producen en la adolescentes (Guerra y Pascual, 2010), o quizás en niveles crónicos (Alfonso-Loeches et al., 2010), además de ver si estos daños se mantienen en la etapa adulta o no.

En la Figura 17, podemos observar mediante inmunoelectrotransferencia, los niveles de GFAP (proteína ácida fibrilar glial que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto de astrocitos), Caspasa-3 (marcador de apoptosis) y Neu N (marcador de neuronas). Para determinar la reactividad astrocítica, usamos GFAP, cuyo aumento es un indicador de procesos de gliosis reactiva o glía activada en distintas enfermedades (Brenner, 2014). De hecho, observamos altos niveles en las distintas etapas de exposición al alcohol (EW, WE y EE) en la CPF, en comparación con sus respectivos controles no tratados WW, aunque para el HIP, no observamos diferencias significativas.

Además, también se midieron los niveles de NeuN, los cuáles disminuyeron en la CPF, indicando que existe una ligera pérdida de neuronas, aunque no es significativa, que junto con el aumento del fragmento activo p17 de la Caspasa-3 (C-3/p17) tanto en las etapas EW como en EE, es un indicativo de muerte celular por apoptosis, y podría indicarnos que existe un leve daño neural que se mantiene en el adulto. Por otro lado, no existen cambios importantes en el HIP, salvo una pequeña alteración de Neu N que disminuye y C-3/p17 que aumenta ligeramente, alteraciones mantenidas en el adulto tras una exposición al alcohol durante ambas etapas del desarrollo (EE). Estos datos confirman que existe daño neural asociado a la exposición al alcohol durante las distintas etapas de la ontogenia temprana y que este daño puede ser mantenido de algún modo en el adulto en la CPF, y en menor medida en el hipocampo.

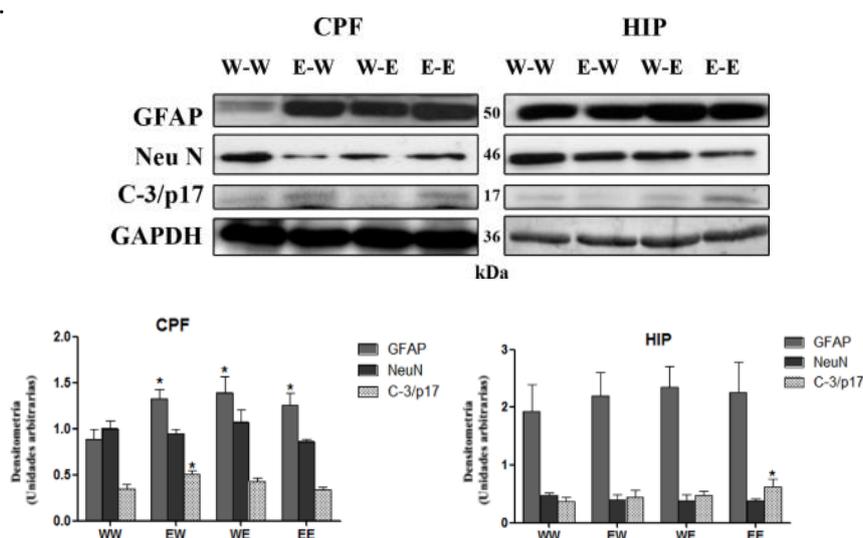


Figura 17: Daño neural asociado a la neuroinflamación producida en el CPF e hipocampo tras la exposición al alcohol durante la ontogenia temprana. Se midieron los niveles de GFAP (marcador de astrocitos), Neu N (marcador de neuronas) y del péptido activo p17 de la Caspasa-3 (marcador de apoptosis) en los distintos casos de estudio. Etapas de consumo: WW, agua; EW, alcohol prenatal; WE, alcohol adolescencia; EE, alcohol en ambas etapas. n=4/condición. # p-valor < 0.1, *p-valor < 0.05 (Test de la U-Mann-Whitney, o bien, Test T Student).

5. DISCUSIÓN

5.1. NEUROINFLAMACIÓN ASOCIADA A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO: PAPEL DE LOS RECEPTORES TLR4/NLRP3.

5.1.1. Activación de los receptores tipo Toll (TLR4) asociados a la exposición al alcohol durante etapas tempranas del desarrollo.

Los receptores tipo Toll tienen un papel clave en el desarrollo de las patologías derivadas del consumo de alcohol en el cerebro (Alfonso-Loeches et al., 2010; Fernández-Lizarbe et al., 2013). Asimismo, también se han estudiado los mecanismos subyacentes desencadenados por la activación de los TLRs, donde un abuso de alcohol produce reducción de masa cerebral y muerte neural (Suzanne, 1988). Este proceso, ha sido estudiado en modelos experimentales crónicos y adolescentes, no obstante, el período que une ambas etapas y al que se podría denominar como adolescencia tardía, no ha sido investigado con anterioridad. Además, aunque distintos estudios describen la exposición al alcohol en el estadio prenatal, y sus efectos dañinos como es el Síndrome Alcohólico Fetal (Guerra et al., 2009), es un campo de estudio poco explorado, el cual va a ser discutido también en este trabajo.

Si el alcohol desencadena una respuesta inflamatoria y posterior degeneración neuronal en estas etapas, puede ser debido al aumento de la expresión de TLRs, concretamente TLR4 y TLR2, como se ha sido descrito en el laboratorio de la Dra. Guerra anteriormente (Blanco et al., 2007; Alfonso-Loeches et al., 2010; Fernández-Lizarbe et al., 2013). Como se ha comprobado en el apartado de resultados, los niveles de ambos receptores aumentaban tanto en corteza prefrontal como en hipocampo, lo que nos indica que existe una sobreactivación mantenida en el adulto de estos receptores inmunes en las distintas situaciones de exposición al alcohol durante períodos tempranos del desarrollo. La activación de los TLRs, está asociada a procesos inflamatorios y degenerativos mediante la producción de citocinas proinflamatorias (Okun et al., 2009), donde también se liberan mediadores inflamatorios, los cuales contribuyen a una mayor neuroinflamación y daño neural.

De hecho, se sabe que NFκB es un factor de transcripción que se ve activado por la señalización de TLR4 y TLR2 tras un consumo de alcohol (Fernández-Lizarbe et al., 2014). Asimismo, también se conoce que su activación es lo que desencadena la producción de mediadores inflamatorios como iNOS y COX-2, la liberación de citocinas proinflamatorias, las cuales tienen una función clave en la respuesta inmune por consumo de alcohol (Blanco et al., 2005; Fernández-Lizarbe et al., 2009; Alfonso-Loeches et al., 2010; 2015). Además de participar en la respuesta inmune, este factor tiene una gran importancia en el SNC puesto que regula procesos como el aprendizaje y la plasticidad neuronal (Albensi y Mattson, 2000; Katschmidt et al., 2006). Por lo tanto, es de esperar que sus niveles también aumenten en la corteza prefrontal e hipocampo, donde se aprecia un incremento considerable de la expresión de los receptores TLRs, lo que se confirma en nuestros resultados, donde existe un aumento significativo del factor NFκB/p65 translocado al núcleo tras una exposición al alcohol durante el desarrollo. Nuestros resultados confirman, que existe una respuesta neuroinflamatoria activa y latente en el individuo adulto tras una exposición al alcohol durante los períodos prenatal, adolescente o en ambas etapas, puesto que existe un aumento de los niveles de receptores TLR4 y TLR2, también de los niveles de iNOS y COX-2, y esto sugiere que tanto el TLR4 como el TLR2, son dianas importantes en los efectos del alcohol en estas dos etapas vitales estudiadas (período prenatal y adolescencia), etapas que influyen principalmente en la toma de decisiones y los procesos de memoria, dependiendo de si la sobreexpresión se produce en corteza prefrontal y/o hipocampo, respectivamente.

5.1.2. Interrelación entre los receptores inmunes TLR4 y NLRP3 tras un abuso de alcohol en el desarrollo: Papel del inflamasoma NLRP3.

Los procesos inflamatorios son vitales para la defensa de organismo frente a PAMPs y DAMPs en el SNC. Pese a ello, muchas enfermedades neurológicas están relacionadas con una neuroinflamación exacerbada, la cual provoca daño neuronal, como ocurre en el caso del Alzheimer (López González et al., 2016). En los procesos de inflamación acontecidos en el SNC se liberan compuestos inflamatorios a través de la señalización de receptores inmunes como son el TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010) y el inflamasoma NLRP3 (Alfonso-Loeches et al., 2014).

Los inflamasomas o receptores tipo NOD participan en la regulación del sistema inmune, especialmente en la inflamación (Ting et al., 2006). De todos los NLRs, el más conocido es el inflamasoma NLRP3. Asimismo, también se sabe que NLRP3 precisa de un intermediario o señal para poder activarse tras la llegada del PAMP o la alarma a la célula (Coll y O'Neill, 2011). Además, distintos estudios han confirmado que la activación de TLR4 debida al consumo de alcohol, actúa como una señal primaria (*priming signal*) que precede a la activación del inflamasoma en cultivos primarios de células nerviosas de ratón (Alfonso-Loeches et al., 2014), como ha sido descrito en otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con procesos de neuroinflamación (Li et al., 2016).

En el presente trabajo, demostramos que un aumento en la expresión de los receptores TLR4 tras una exposición al alcohol e independientemente de la etapa del desarrollo, va ligado a un daño neural provocado en parte por procesos de neuroinflamación. Asimismo, los resultados de los experimentos realizados en este trabajo, indican un aumento significativo de la expresión del inflamasoma NLRP3, tanto en corteza prefrontal como en hipocampo, en las condiciones de exposición al alcohol durante la etapa prenatal y/o adolescente. Los datos obtenidos tanto de TLR4 como de NLRP3 están correlacionados, por lo que se deduce que la ruta de inflamación en la que participan ambos receptores está activada.

De hecho, nuestros datos revelan un aumento significativo de los niveles de Caspasa-1 activa y de NLRP3, datos que confirman la formación del complejo del inflamasoma NLRP3, donde la Caspasa-1 mediaría la maduración y procesamiento de pro-IL-1, desencadenando la liberación de citocinas pro inflamatorias como IL-1 β , IL-18 e IL-33 (Alfonso-Loeches et al., 2014; 2016). Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente los niveles de Caspasa-1 aumentaban significativamente al igual que los de NLRP3, tanto en córtex prefrontal como en hipocampo del individuo adulto tras una exposición al etanol durante la etapa prenatal, adolescente y/o durante ambas etapas. De hecho, una activación del inflamasoma conduce a muerte celular por piroptosis, como ya se ha descrito anteriormente, donde se liberan citocinas que atraen a células del sistema inmune como son los macrófagos (Fink y Cookson, 2005) durante procesos inflamatorios causados por cualquier infección o daño (Kinoshita, 2016).

5.1.3. Producción de IL-1 β , citocina proinflamatoria implicada en la neuroinflamación tras una exposición al alcohol durante el desarrollo.

En el proceso inflamatorio se liberan diversas citocinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-18, TNF- α etc. que serán las responsables de llevar a cabo la respuesta inmune inflamatoria (Coll y O'Neill, 2012).

El alcohol es capaz de producir la liberación de citocinas como IL-1 β , tras desencadenar una respuesta neuroinflamatoria, donde se activa la cascada de señalización de TLR4/NLRP3. De hecho, se ha demostrado que el consumo de alcohol causa una activación de estos receptores del sistema innato inmunitario dando lugar a la liberación de citocinas proinflamatorias como IL-1 β (Alfonso-Loeches et al., 2014; 2016). La liberación de citocinas está en parte mediada por una activación del factor de transcripción nuclear NF κ B/p65, que dará lugar a la producción de

pro-IL-1, y que posteriormente participa en la activación del inflamasoma con la producción de IL-1 β . De hecho, existen estudios que demuestran que esta citocina, aumenta sus niveles de expresión en adultos que fueron expuestos al etanol durante las etapas prenatal y/o adolescente (Alfonso-Loeches y Guerri, 2011). Asimismo, nuestros resultados apoyan que los niveles de IL-1 β se incrementan significativamente en las áreas de CPF e hipocampo en los individuos adultos tras una exposición al alcohol durante el desarrollo, por lo que queda demostrado que los receptores inmunes TLR4/NLRP3 y sus rutas de señalización asociadas, son uno de los principales mecanismos implicados en esta respuesta neuroinflamatoria asociada al abuso de alcohol en etapas tempranas del desarrollo. Del mismo modo, demostramos que existe una neuroinflamación notable, que se mantiene en mayor o menor grado en el organismo adulto tras períodos de exposición al alcohol en las etapas prenatal y/o adolescente, procesos neuroinflamatorios que pueden afectar en cierto grado a los procesos normales de aprendizaje, memoria, toma de decisiones, etc. en el individuo adulto.

5.2. ALTERACIONES EN MIELINIZACIÓN DEBIDAS A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE EL DESARROLLO.

Existen numerosos estudios que indican que el consumo de alcohol, produce pérdida de grosor de la vaina de mielina a través de procesos de neuroinflamación (Sloane et al., 2010). De hecho, varios trabajos demuestran la asociación entre neurodegeneración, neuroinflamación y disminución de materia blanca cerebral (Glass et al., 2010). Normalmente, los procesos asociados a la desmielinización, suelen formar parte del cuadro clínico de diferentes enfermedades autoinmunes y/o neurodegenerativas como la esclerosis múltiple (Back et al., 2005) o la encefalomiелitis diseminada aguda (Kadhim et al., 2003), por lo que es interesante averiguar si ocurren procesos de desmielinización en nuestro modelo experimental.

Como hemos expuesto anteriormente, nuestros resultados indican claras y notables alteraciones del factor regulador de la mielina (MYRF), el cual sufre una disminución en su expresión en CPF en los distintos casos de exposición al alcohol durante el desarrollo (EW, WE y EE), lo que va ligado a una consecuente desmielinización, como se demuestra en otros estudios (Koening et al., 2012). No obstante, el hipocampo se mantiene estable, lo que indica que este factor no se ve alterado por la exposición al alcohol en nuestro modelo experimental. Del mismo modo, en este trabajo se demuestra que las proteínas que son reguladas por MYRF y que participan en el proceso de la formación y el mantenimiento de la vaina de mielina, como son PLP, MAG y MBP, disminuyen significativamente en los casos de exposición a alcohol en el CPF, o cuanto menos tienen tendencia a la disminución, lo que correlaciona con los datos obtenidos en MYRF para este modelo experimental. No obstante, en el hipocampo se percibió un descenso en algunos casos en la expresión de estas proteínas asociadas a los procesos de desmielinización, aunque no de manera tan pronunciada como ocurría en la corteza prefrontal, y de acuerdo a los datos obtenidos para MYRF en esta área.

Esta pérdida de proteínas relacionadas con la mielina, la cual se asocia a la disminución del grosor de su vaina, sugieren que la neuroinflamación que acontece a causa de la exposición al alcohol durante el desarrollo, como se ha demostrado en el apartado anterior, desencadena un daño en los procesos de mielinización, llevando incluso a pérdida neuronal como hemos visto previamente en nuestros resultados, donde se indica que existe cierto daño neural asociado a esta neuroinflamación, y que discutiremos más adelante. De hecho, algunos estudios confirman la relación entre la activación de los receptores TLR4, neuroinflamación y daños en mielinización asociados al consumo de alcohol (Alfonso-Loeches et al., 2012; Montesinos et al, 2015).

Las alteraciones de la materia blanca, sobre todo en CPF, puesto que en hipocampo no se ha visto que sea muy marcada, hace que el impulso nervioso vaya mucho más lento de lo que debería, produciendo daño severo en las funciones de la corteza prefrontal, de hecho, algunos trabajos asocian el consumo de alcohol por “*binge-drinking*” con alteraciones en los mecanismos de inhibición, toma de decisiones y racionalización (Euston et al., 2012).

5.3. LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE LA ONTOGENIA TEMPRANA PRODUCE CAMBIOS EPIGENÉTICOS.

Existen evidencias que demuestran que la epigenética tiene un rol muy importante en los procesos de aprendizaje y memoria (Graff y Mansuy, 2009; Malvaez et al., 2009). Además, existen muchos estudios que describen cómo el consumo de alcohol en adolescentes es capaz de alterar estos mecanismos, donde se observa un cambio de comportamiento en la expresión genética por las diferentes alteraciones epigenéticas (Pascual et al., 2012). También, se ha demostrado que la idea de modificar artificialmente los cambios epigenéticos, puede ser una potente herramienta terapéutica para paliar la sintomatología de diversas enfermedades (Pirooznia y Elefant, 2013). Por ello, al conocer exactamente qué cambios epigenéticos acontecen en nuestro modelo experimental, daremos un paso importante en posibles terapias para el tratamiento del alcoholismo o incluso, en casos como el Síndrome Alcohólico Fetal.

Nuestros resultados, demuestran que las histonas se ven alteradas a nivel epigenético en diferentes lisinas, tanto en corteza prefrontal como en hipocampo. La acetilación de las histonas es muy evidente, lo que conlleva una activación de ciertos genes que previamente estaban reprimidos (Zakhari, 2013). Asimismo, también se ha visto que la metilación de histonas es prácticamente inexistente por consumo de alcohol, tal y como muestran nuestros resultados, lo que correlaciona con la hipótesis de un aumento de la expresión genética, puesto que la metilación de histonas va ligada a represión genética (Lacoste 2002). No obstante, hay que tener en cuenta que hay estudios que asocian el consumo de alcohol con una disminución en la acetilación y por tanto, un aumento de actividad de la enzima HDAC (Pascual et al., 2012; Sakharkar et al., 2016) lo que lleva a la suposición de que el alcohol no afecta de igual manera a todas las etapas de la vida durante el desarrollo a nivel epigenético, y que un consumo o exposición prenatal y/o adolescente al alcohol, sobre todo a nivel prenatal, puede activar mecanismos de acetilación de histonas como se ha visto en este trabajo y como defienden otros autores (Wang et al., 2007; Finegersh, et al., 2015).

Existen distintos estudios que muestran que los TLRs y su activación, pueden derivar en cambios epigenéticos por remodelación en la cromatina (Foster et al., 2007). Esto se sabe que ocurre en el consumo de alcohol de adolescentes (Pascual et al., 2012; Montesinos et al., 2016), y además se ha visto como la neuroinflamación también participa en alteraciones epigenéticas en enfermedades neurodegenerativas como pueden ser el Alzheimer o el Huntington (Sadri-Vakili et al., 2007; Sweatt, 2010). En los resultados del presente trabajo, se ha visto como aumenta la expresión de los receptores inmunes, especialmente TLR4, lo que correlaciona con la acetilación de histonas que se da a causa de un consumo de alcohol y que se ha discutido en este apartado. Esto hace suponer que la neuroinflamación también está relacionada con la modulación epigenética en nuestro modelo experimental.

5.4. DAÑO NEURAL ASOCIADO A LA EXPOSICIÓN AL ALCOHOL DURANTE ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO.

Como hemos visto, el alcohol es un compuesto neurotóxico que actúa sobre el cerebro de manera negativa a distintos niveles, mediante procesos de neuroinflamación, gliosis, produciendo muerte celular programada (Alfonso-Loeches et al, 2010; 2014) o incluso

disminuye la velocidad de transmisión del impulso nervioso a causa de alteraciones en la mielina (Alfonso-Loeches et al., 2012) entre otros. Todos estos procesos de neurodegeneración y neuroinflamación asociados al consumo de alcohol, son capaces de mermar las funciones cerebrales a niveles superiores, puesto que acontece una pérdida de neuronas importante (Herculano-Houzel y Lent, 2005), una gliosis reactiva (Brenner, 2014) y muerte celular por fragmentación del DNA (Salvesen, 2002). En el apartado de resultados, se expone como varían los niveles de tres proteínas clave en los procesos asociados a daño descritos: NeuN, GFAP y Caspasa-3, respectivamente, con el fin de estudiar si existe un daño neural asociado que se mantenga en el adulto, tras una exposición al alcohol durante la ontogenia temprana.

La pérdida de neuronas la hemos estudiado mediante el uso de NeuN, proteína nuclear que actúa como biomarcador de neuronas. En efecto, cuando su nivel resulta más bajo en los consumidores habituales de alcohol, es debido a que existe muerte neuronal (Herculano-Houzel y Lent, 2005). Nuestros resultados, muestran una disminución de esta proteína y, por tanto, se deduce que la cantidad de neuronas, sobre todo en CPF, es mucho menor en los casos de una exposición temprana al alcohol (EW, WE y EE) que en los controles (WW). Esto puede ser debido a la pérdida del grosor de la vaina de mielina, como se ha adelantado en apartados anteriores (Brooks, 2000; Alfonso-Loeches et al., 2012), ya que hemos visto alteraciones en las proteínas implicadas en procesos de mielinización durante estas mismas etapas.

Asimismo, para determinar si existen procesos de gliosis reactiva, usamos la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto de astrocitos. De hecho, activaciones o incrementos en la inmunoreactividad de la GFAP, son considerados como marcadores de neurotoxicidad tras un daño neural (Otani et al., 2006), además de participar en mecanismos de neurodegeneración (Maragakis and Rothstein, 2006). Como hemos expuesto en el apartado de resultados, los niveles de GFAP aumentan en mayor o menor grado en las dos áreas cerebrales estudiadas tras una exposición temprana al alcohol durante el desarrollo. Esto es indicativo de que puede existir una gliosis reactiva derivada de esta exposición temprana al alcohol, de hecho, diversos estudios indican que los procesos de gliosis son debidos a un aumento de astrocitos en zonas lesionadas del cerebro, formando lo que se conoce como cicatrices gliales (Brenner, 2014).

Todo esto en conjunto, asociado a una posible activación de la Caspasa-3 (C3), marcador de apoptosis o fragmentación de ADN (Salvesen, 2002), indicaría que el consumo de alcohol durante etapas tempranas del desarrollo, produce un daño neural asociado a procesos neuroinflamatorios que se mantienen en el adulto, y donde hemos visto que uno de los mecanismos que podrían estar involucrados en estos procesos, implican la activación de los receptores TLR4 y NLRP3, receptores inmunes asociados a la neuroinflamación y daño neural causado por un abuso de alcohol.

6. CONCLUSIONES

1. Tanto la corteza prefrontal como el hipocampo son dos áreas cerebrales que se ven profundamente afectadas por el consumo de alcohol durante el desarrollo.
2. La exposición al alcohol durante períodos críticos del desarrollo del cerebro como, la etapa prenatal y la adolescencia tardía:
 - 2.1 Activa la señalización del TLR4, produciendo mediadores y citocinas proinflamatorias que causan neuroinflamación y alteran procesos clave en el desarrollo del cerebro, que son irreversibles, ya que se mantienen en el individuo adulto.
 - 2.2 Incrementa y activa los niveles del inflammasoma NLRP3/Caspasa-1, amplificando la neuroinflamación asociada a la exposición al alcohol durante estas etapas, y produciendo elevados niveles de citocinas proinflamatorias como IL-1 β .
 - 2.3 Causa alteraciones de mielinización en el individuo adulto, mediante la reducción de los niveles de diferentes proteínas asociadas a estos procesos. Comprobamos que el TLR4 tiene un papel fundamental en la activación de mediadores que conllevan a modificaciones en el grosor de la vaina de mielina.
 - 2.4 Provoca la acetilación de histonas y el descenso de actividad de la HDAC activando la expresión de genes antes inactivos, debido a la neuroinflamación y la neurodegeneración producidas.
3. Además, la exposición temprana al alcohol produce daño cerebral asociado a procesos de gliosis reactiva, disminución en el número de neuronas e incremento de la muerte neural por apoptosis.
4. Finalmente, los resultados de este estudio demuestran que la exposición al etanol durante períodos críticos del desarrollo del cerebro puede tener consecuencias irreversibles que podrían conllevar disfunciones cognitivas y conductuales importantes en el individuo adulto, como se ha demostrado en otros estudios.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alati, R., Clavarino, A., Najman, J. M., O'Callaghan, M., Bor, W., Al Mamun, A., & Williams, G. M. (2008). The developmental origin of adolescent alcohol use: findings from the Mater University Study of Pregnancy and its outcomes. *Drug and alcohol dependence*, *98*(1), 136-143.
- Albensi, B. C., & Mattson, M. P. (2000). Evidence for the involvement of TNF and NF- κ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse-New York*, *35*(2), 151-159.
- Alfonso-Loeches, S., & Guerri, C. (2011). Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, *48*(1), 19-47.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2013). Gender differences in alcohol-induced neurotoxicity and brain damage. *Toxicology*, *311*(1), 27-34.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual, M., Gómez-Pinedo, U., Pascual-Lucas, M., Renau-Piqueras, J., & Guerri, C. (2012). Toll-like receptor 4 participates in the myelin disruptions associated with chronic alcohol abuse. *Glia*, *60*(6), 948-964.
- Alfonso-Loeches, S., Pascual-Lucas, M., Blanco, A. M., Sanchez-Vera, I., & Guerri, C. (2010). Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *The Journal of Neuroscience*, *30*(24), 8285-8295.
- Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J. R., Morillo-Bargues, M. J., Oliver-De La Cruz, J., & Guerri, C. (2014). Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. *Front Cell Neurosci*, *8*, 216.
- Alfonso-Loeches, S., Ureña-Peralta, J., Morillo-Bargues, M. J., Gómez-Pinedo, U., & Guerri, C. (2015). Ethanol-Induced TLR4/NLRP3 Neuroinflammatory Response in Microglial Cells Promotes Leukocyte Infiltration Across the BBB. *Neurochemical research*, 1-17.
- American Academy of Pediatrics. (2000). Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders. *Pediatrics*, *106*(2), 358-361.
- Back, S. A., Tuohy, T. M., Chen, H., Wallingford, N., Craig, A., Struve, J., ... & Trapp, B. D. (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nature medicine*, *11*(9), 966-972.
- Baer, J. S., Sampson, P. D., Barr, H. M., Connor, P. D., & Streissguth, A. P. (2003). A 21-year longitudinal analysis of the effects of prenatal alcohol exposure on young adult drinking. *Archives of general psychiatry*, *60*(4), 377-385.
- Bauernfeind, F. G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E. S., MacDonald, K., Speert, D., ... & Hornung, V. (2009). Cutting edge: NF- κ B activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *The Journal of Immunology*, *183*(2), 787-791.
- Bautista, A. P., & Wang, E. (2001). Chronic ethanol intoxication enhances the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and macrophage inflammatory protein-2 by hepatocytes after human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 vaccination. *Alcohol*, *24*(1), 35-44.
- Bava, S., & Tapert, S. F. (2010). Adolescent brain development and the risk for alcohol and other drug problems. *Neuropsychology review*, *20*(4), 398-413.

- Becker, C. E., & O'Neill, L. A. (2007, September). Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 29, No. 3, pp. 239-248). Springer-Verlag.
- Becker, H. C., & Lopez, M. F. (2016). Chapter Six-An Animal Model of Alcohol Dependence to Screen Medications for Treating Alcoholism. *International Review of Neurobiology*, 126, 157-177.
- Blanco, A. M., Perez-Arago, A., Fernandez-Lizarbe, S., & Guerri, C. (2008). Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *Journal of neurochemistry*, 106(2), 625-639.
- Blanco, A. M., Vallés, S. L., Pascual, M., & Guerri, C. (2005). Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *The Journal of Immunology*, 175(10), 6893-6899.
- Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters*, 565, 7-13.
- Broadwater, M. A., Liu, W., Crews, F. T., & Spear, L. P. (2014). Persistent loss of hippocampal neurogenesis and increased cell death following adolescent, but not adult, chronic ethanol exposure. *Developmental neuroscience*, 36(3-4), 297-305.
- Brooks, P. J. (2000). Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage?. *Neurochemistry international*, 37(5), 403-412.
- Bruce, C. C., Zhao, C., & Franklin, R. J. (2010). Remyelination—an effective means of neuroprotection. *Hormones and behavior*, 57(1), 56-62.
- Bühler, M., & Mann, K. (2011). Alcohol and the human brain: a systematic review of different neuroimaging methods. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(10), 1771-1793.
- Caldwell, L. C., Schweinsburg, A. D., Nagel, B. J., Barlett, V. C., Brown, S. A., & Tapert, S. F. (2005). Gender and adolescent alcohol use disorders on BOLD (blood oxygen level dependent) response to spatial working memory. *Alcohol and alcoholism*, 40(3), 194-200.
- Caputi, F. F., Palmisano, M., D'Addario, C., Candeletti, S., & Romualdi, P. (2015). Effects of acute ethanol exposure on class I HDACs family enzymes in wild-type and BDNF+/- mice. *Drug and alcohol dependence*, 155, 68-75.
- Cardenas, V. A., Studholme, C., Gazdzinski, S., Durazzo, T. C., & Meyerhoff, D. J. (2007). Deformation-based morphometry of brain changes in alcohol dependence and abstinence. *Neuroimage*, 34(3), 879-887.
- Ceccarelli, I., Della Seta, D., Fiorenzani, P., Farabollini, F., & Aloisi, A. M. (2007). Estrogenic chemicals at puberty change ER α in the hypothalamus of male and female rats. *Neurotoxicology and teratology*, 29(1), 108-115.
- Charness, M. E. (1993). Brain lesions in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 17(1), 2-11.
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, 10(12), 826-837.

- Coleman, L. G., Liu, W., Oguz, I., Styner, M., & Crews, F. T. (2014). Adolescent binge ethanol treatment alters adult brain regional volumes, cortical extracellular matrix protein and behavioral flexibility. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *116*, 142-151.
- Coll, R. C., & O'Neill, L. A. (2011). The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *PLoS One*, *6*(12), e29539.
- Crego, A., Holguín, S. R., Parada, M., Mota, N., Corral, M., & Cadaveira, F. (2009). Binge drinking affects attentional and visual working memory processing in young university students. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *33*(11), 1870-1879.
- Crews, F., He, J., & Hodge, C. (2007). Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *86*(2), 189-199.
- Devaux, J. J., & Scherer, S. S. (2005). Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *The Journal of neuroscience*, *25*(6), 1470-1480.
- Edgar, J. M., McLaughlin, M., Yool, D., Zhang, S. C., Fowler, J. H., Montague, P., ... & Nave, K. A. (2004). Oligodendroglial modulation of fast axonal transport in a mouse model of hereditary spastic paraplegia. *The Journal of cell biology*, *166*(1), 121-131.
- Ehlers, C. L., Liu, W., Wills, D. N., & Crews, F. T. (2013). Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience*, *244*, 1-15.
- Euston, D. R., Gruber, A. J., & McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, *76*(6), 1057-1070.
- Felts, P. A., Woolston, A. M., Fernando, H. B., Asquith, S., Gregson, N. A., Mizzi, O. J., & Smith, K. J. (2005). Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain*, *128*(7), 1649-1666.
- Fernandez-Lizarbe, S., Montesinos, J., & Guerri, C. (2013). Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *Journal of neurochemistry*, *126*(2), 261-273.
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., & Guerri, C. (2009). Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *The Journal of Immunology*, *183*(7), 4733-4744.
- Finegersh, A., Ferguson, C., Maxwell, S., Mazariegos, D., Farrell, D., & Homanics, G. E. (2015). Repeated vapor ethanol exposure induces transient histone modifications in the brain that are modified by genotype and brain region. *Frontiers in molecular neuroscience*, *8*.
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, *73*(4), 1907-1916.
- Foster, S. L., Hargreaves, D. C., & Medzhitov, R. (2007). Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, *447*(7147), 972-978.
- Franchi, L., Muñoz-Planillo, R., & Núñez, G. (2012). Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature immunology*, *13*(4), 325-332.
- Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., ... & Diaz, F. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, *485*(7399), 517-521.

- Gao, J., & Zheng, Z. (2015). Development of prognostic models for patients with traumatic brain injury: a systematic review. *Int J Clin Exp Med*, 8(11), 19881-19885.
- Ghosh, S., & Dass, J. F. P. (2016). Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene*, 584(1), 97-109.
- Giedd, J. N. (2004). Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021(1), 77-85.
- Gilbert, F. (2003). Criteria for newborn screening. *Genetic testing*, 7(1), 37-38.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918-934.
- Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., ... & Rapoport, J. L. (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.
- Gogtay, N., Giedd, J. N., Lusk, L., Hayashi, K. M., Greenstein, D., Vaituzis, A. C., ... & Rapoport, J. L. (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.
- Gräff, J., & Mansuy, I. M. (2009). Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *European Journal of Neuroscience*, 30(1), 1-8.
- Gräff, J., Rei, D., Guan, J. S., Wang, W. Y., Seo, J., Hennig, K. M., ... & Su, S. C. (2012). An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature*, 483(7388), 222-226.
- Grant, B. F., & Dawson, D. A. (1997). Age at onset of alcohol use and its association with DSM-IV alcohol abuse and dependence: results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *Journal of substance abuse*, 9, 103-110.
- Guerri, C. (2002). Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotoxicity research*, 4(4), 327-335.
- Guerri, C., & Pascual, M. (2010). Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol*, 44(1), 15-26.
- Guerri, C., Bazinet, A., & Riley, E. P. (2009). Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol and alcoholism*, 44(2), 108-114.
- Harper, C., & Matsumoto, I. (2005). Ethanol and brain damage. *Current opinion in pharmacology*, 5(1), 73-78.
- Herculano-Houzel, S., & Lent, R. (2005). Isotropic fractionator: a simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *The Journal of neuroscience*, 25(10), 2518-2521.
- Hibell, B., Guttormsson, U., Ahlström, S., Balakireva, O., Bjarnason, T., Kokkevi, A., & Kraus, L. (2009). The 2007 ESPAD report. *Substance use among students in*, 35.

- Hingson, R. W., & Zha, W. (2009). Age of drinking onset, alcohol use disorders, frequent heavy drinking, and unintentionally injuring oneself and others after drinking. *Pediatrics*, *123*(6), 1477-1484.
- Hittner, J. B., & Swickert, R. (2006). Sensation seeking and alcohol use: A meta-analytic review. *Addictive behaviors*, *31*(8), 1383-1401.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, *1*(2), 76-80.
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, *5*(10), 987-995.
- Jernigan, D. H. (2001). *Global status report: alcohol and young people* (p. 57). Geneva: World Health Organization.
- Johnston, L. (2010). *Monitoring the future: National results on adolescent drug use: Overview of key findings* (No. 9). DIANE Publishing.
- Jones, K., & Smith, D. (1973). Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *The Lancet*, *302*(7836), 999-1001.
- Joshi, P. C., & Guidot, D. M. (2007). The alcoholic lung: epidemiology, pathophysiology, and potential therapies. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *292*(4), L813-L823.
- Kadhim, H., De Prez, C., Gazagnes, M. D., & Sébire, G. (2003). In situ cytokine immune responses in acute disseminated encephalomyelitis: insights into pathophysiologic mechanisms. *Human pathology*, *34*(3), 293-297.
- Kahlenberg, J. M., Lundberg, K. C., Kertesz, S. B., Qu, Y., & Dubyak, G. R. (2005). Potentiation of caspase-1 activation by the P2X7 receptor is dependent on TLR signals and requires NF- κ B-driven protein synthesis. *The Journal of Immunology*, *175*(11), 7611-7622.
- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prüllage, M., ... & Kaltschmidt, C. (2006). NF- κ B regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Molecular and cellular biology*, *26*(8), 2936-2946.
- Kang, T. S., Woo, S. W., Park, H. J., Lee, Y., & Roh, J. (2009). Comparison of genetic polymorphisms of CYP2E1, ADH2, and ALDH2 genes involved in alcohol metabolism in Koreans and four other ethnic groups. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, *34*(2), 225-230.
- Kassmann, C. M., & Nave, K. A. (2008). Oligodendroglial impact on axonal function and survival—a hypothesis. *Current opinion in neurology*, *21*(3), 235-241.
- Kelly, S. J., Goodlett, C. R., & Hannigan, J. H. (2009). Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. *Developmental disabilities research reviews*, *15*(3), 200-208.
- Kinoshita, K. (2016). Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. *Journal of Intensive Care*, *4*(1), 1.
- Koenning, M., Jackson, S., Hay, C. M., Faux, C., Kilpatrick, T. J., Willingham, M., & Emery, B. (2012). Myelin gene regulatory factor is required for maintenance of myelin and mature oligodendrocyte identity in the adult CNS. *The Journal of Neuroscience*, *32*(36), 12528-12542.

- Konishi, T., Calvillo, M., Leng, A. S., Feng, J., Lee, T., Lee, H., ... & Eysselein, V. (2003). The ADH3* 2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Experimental and molecular pathology*, 74(2), 183-189.
- Konrad, A., Vucurevic, G., Lorscheider, M., Bernow, N., Thümmel, M., Chai, C., ... & Fehr, C. (2012). Broad disruption of brain white matter microstructure and relationship with neuropsychological performance in male patients with severe alcohol dependence. *Alcohol and Alcoholism*, 47(2), 118-126.
- Koren, G. (2002). Drinking alcohol while breastfeeding. Will it harm my baby?. *Canadian Family Physician*, 48(1), 39-41.
- Lacoste, N., Utley, R. T., Hunter, J. M., Poirier, G. G., & Côté, J. (2002). Disruptor of telomeric silencing-1 is a chromatin-specific histone H3 methyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(34), 30421-30424.
- Lau, A. H., Abe, M., & Thomson, A. W. (2006). Ethanol affects the generation, cosignaling molecule expression, and function of plasmacytoid and myeloid dendritic cell subsets in vitro and in vivo. *Journal of leukocyte biology*, 79(5), 941-953.
- Lau, A., von Dossow, V., Sander, M., MacGuill, M., Lanzke, N., & Spies, C. (2009). Alcohol use disorder and perioperative immune dysfunction. *Anesthesia & Analgesia*, 108(3), 916-920.
- Li, J., Csakai, A., Jin, J., Zhang, F., & Yin, H. (2016). Therapeutic Developments Targeting Toll-like Receptor-4-Mediated Neuroinflammation. *ChemMedChem*, 11(2), 154-165.
- Lippai, D., Bala, S., Csak, T., Kurt-Jones, E. A., & Szabo, G. (2013). Chronic alcohol-induced microRNA-155 contributes to neuroinflammation in a TLR4-dependent manner in mice. *PLoS One*, 8(8), e70945.
- Little, R. E., Northstone, K., & Golding, J. (2002). Alcohol, breastfeeding, and development at 18 months. *Pediatrics*, 109(5), e72-e72.
- Liu, J., Lewohl, J. M., Harris, R. A., Iyer, V. R., Dodd, P. R., Randall, P. K., & Mayfield, R. D. (2006). Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1574-1582.
- Liu, W., & Crews, F. T. (2015). Adolescent intermittent ethanol exposure enhances ethanol activation of the nucleus accumbens while blunting the prefrontal cortex responses in adult rat. *Neuroscience*, 293, 92-108.
- López González, I., Garcia-Esparcia, P., Llorens, F., & Ferrer, I. (2016). Genetic and transcriptomic profiles of inflammation in neurodegenerative diseases: Alzheimer, Parkinson, Creutzfeldt-Jakob and tauopathies. *International journal of molecular sciences*, 17(2), 206.
- Love, S. (2006). Demyelinating diseases. *Journal of clinical pathology*, 59(11), 1151-1159.
- Luczak, S. E., Glatt, S. J., & Wall, T. J. (2006). Meta-analyses of ALDH2 and ADH1B with alcohol dependence in Asians. *Psychological bulletin*, 132(4), 607.
- Malvaez, M., Barrett, R. M., Wood, M. A., & Sanchis-Segura, C. (2009). Epigenetic mechanisms underlying extinction of memory and drug-seeking behavior. *Mammalian Genome*, 20(9-10), 612-623.

- Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Bellerose, G., Kodys, K., Romics, L., Nizamani, R., & Szabo, G. (2002). Acute Alcohol Inhibits the Induction of Nuclear Regulatory Factor κ B Activation Through CD14/Toll-Like Receptor 4, Interleukin-1, and Tumor Necrosis Factor Receptors: A Common Mechanism Independent of Inhibitory κ B α Degradation?. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(11), 1609-1614.
- Mariathasan, S., & Monack, D. M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(1), 31-40.
- Marta, M., Meier, U. C., & Lobell, A. (2009). Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmunity reviews*, 8(6), 506-509.
- Mattson, S. N., & Riley, E. P. (1998). A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 22(2), 279-294.
- Meyers, J. L., & Dick, D. M. (2010). Genetic and environmental risk factors for adolescent-onset substance use disorders. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America*, 19(3), 465-477.
- Miao, E. A., Rajan, J. V., & Aderem, A. (2011). Caspase-1-induced pyroptotic cell death. *Immunological reviews*, 243(1), 206-214.
- Miron, V. E., & Franklin, R. J. (2014). Macrophages and CNS remyelination. *Journal of neurochemistry*, 130(2), 165-171.
- 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.
- 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*.
- Moss, M., Parsons, P. E., Steinberg, K. P., Hudson, L. D., Guidot, D. M., Burnham, E. L., ... & Cotsonis, G. A. (2003). Chronic alcohol abuse is associated with an increased incidence of acute respiratory distress syndrome and severity of multiple organ dysfunction in patients with septic shock. *Critical care medicine*, 31(3), 869-877.
- Nave, K. A. (2010). Myelination and the trophic support of long axons. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(4), 275-283.
- Nave, K. A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu. Rev. Neurosci.*, 31, 535-561.
- Norman, A. L., Crocker, N., Mattson, S. N., & Riley, E. P. (2009). Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders. *Developmental disabilities research reviews*, 15(3), 209-217.
- Nutt, D. J., King, L. A., & Phillips, L. D. (2010). Drug harms in the UK: a multicriteria decision analysis. *The Lancet*, 376(9752), 1558-1565.
- Okun, E., Griffioen, K. J., Lathia, J. D., Tang, S. C., Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2009). Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain research reviews*, 59(2), 278-292.

- Ornoy, A., & Ergaz, Z. (2010). Alcohol abuse in pregnant women: effects on the fetus and newborn, mode of action and maternal treatment. *International journal of environmental research and public health*, 7(2), 364-379.
- Pandey, S. C., Sakharkar, A. J., Tang, L., & Zhang, H. (2015). Potential role of adolescent alcohol exposure-induced amygdaloid histone modifications in anxiety and alcohol intake during adulthood. *Neurobiology of disease*, 82, 607-619.
- Pascual, M., Blanco, A. M., Cauli, O., Minarro, 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., Boix, J., Felipo, V., & Guerri, C. (2009). Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and promotes alcohol intake in the adult rat. *Journal of neurochemistry*, 108(4), 920-931.
- Pascual, M., Do Couto, B. R., Alfonso-Loeches, S., Aguilar, M. A., Rodriguez-Arias, M., & Guerri, C. (2012). Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology*, 62(7), 2309-2319.
- Pascual, M., Pla, A., Miñarro, J., & Guerri, C. (2014). Neuroimmune activation and myelin changes in adolescent rats exposed to high-dose alcohol and associated cognitive dysfunction: a review with reference to human adolescent drinking. *Alcohol and alcoholism*, 49(2), 187-192.
- Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Spear, N. E., & Molina, J. C. (2012). Prenatal ethanol exposure leads to greater ethanol-induced appetitive reinforcement. *Alcohol*, 46(6), 585-593.
- Perkins, A., Lehmann, C., Lawrence, R. C., & Kelly, S. J. (2013). Alcohol exposure during development: impact on the epigenome. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 31(6), 391-397.
- Persaud, T. V. N., & Moore, K. L. (1974). Causes and prenatal diagnosis of congenital abnormalities. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 3(4), 50-55.
- Pfefferbaum, A., Rosenbloom, M. J., Fama, R., Sassoon, S. A., & Sullivan, E. V. (2010). Transcallosal white matter degradation detected with quantitative fiber tracking in alcoholic men and women: selective relations to dissociable functions. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(7), 1201-1211.
- Pirooznia, S. K., & Elefant, F. (2013). Targeting specific HATs for neurodegenerative disease treatment: translating basic biology to therapeutic possibilities. *Front Cell Neurosci*, 7, 30.
- Qin, L., He, J., Hanes, R. N., Pluzarev, O., Hong, J. S., & Crews, F. T. (2008). Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *Journal of neuroinflammation*, 5(1), 10.
- Renthal, W., & Nestler, E. J. (2008). Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends in molecular medicine*, 14(8), 341-350.
- Sadri-Vakili, G., Bouzou, B., Benn, C. L., Kim, M. O., Chawla, P., Overland, R. P., ... & Clark, T. W. (2007). Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Human molecular genetics*, 16(11), 1293-1306.

- Sakharkar, A. J., Vetreno, R. P., Zhang, H., Kokare, D. M., Crews, F. T., & Pandey, S. C. (2016). A role for histone acetylation mechanisms in adolescent alcohol exposure-induced deficits in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis markers in adulthood. *Brain Structure and Function*, 1-13.
- Salvesen, G. S. (2002). Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell death and differentiation*, 9(1), 3-5.
- Schroder, K., & Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832.
- Schweinsburg, B. C., Alhassoon, O. M., Taylor, M. J., Gonzalez, R., Videen, J. S., Brown, G. G., ... & Grant, I. (2003). Effects of alcoholism and gender on brain metabolism. *American Journal of Psychiatry*.
- Silveri, M. M. (2012). Adolescent brain development and underage drinking in the United States: identifying risks of alcohol use in college populations. *Harvard review of psychiatry*, 20(4), 189-200.
- Sloane, J. A., Batt, C., Ma, Y., Harris, Z. M., Trapp, B., & Vartanian, T. (2010). Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and remyelination through TLR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25), 11555-11560.
- Sokol, R. J., Delaney-Black, V., & Nordstrom, B. (2003). Fetal alcohol spectrum disorder. *Jama*, 290(22), 2996-2999.
- Squeglia, L. M., Rinker, D. A., Bartsch, H., Castro, N., Chung, Y., Dale, A. M., ... & Tapert, S. F. (2014). Brain volume reductions in adolescent heavy drinkers. *Developmental cognitive neuroscience*, 9, 117-125.
- Squeglia, L. M., Tapert, S. F., Sullivan, E. V., Jacobus, J., Meloy, M. J., Rohlfing, T., & Pfefferbaum, A. (2015). Brain development in heavy-drinking adolescents. *American journal of psychiatry*, 172(6), 531-542.
- Streissguth, A. P., Aase, J. M., Clarren, S. K., Randels, S. P., LaDue, R. A., & Smith, D. F. (1991). Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *Jama*, 265(15), 1961-1967.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., ... & Flavell, R. A. (2006). Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity*, 24(3), 317-327.
- Suzanne, M. (1988). Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Archives of Neurology*, 45(9), 990-992.
- Sweatt, J. D. (2010). Epigenetics and cognitive aging. *Science*, 328(5979), 701-702.
- Szabo, G., & Mandrekar, P. (2009). A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(2), 220-232.
- Szabo, G., & Zakhari, S. (2011). Mechanisms of alcohol-mediated hepatotoxicity in human-immunodeficiency-virus-infected patients.
- Szabo, G., Catalano, D., White, B., & Mandrekar, P. (2004). Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 28(5), 824-828.

- Tan, C. H., Denny, C. H., Cheal, N. E., Sniezek, J. E., & Kanny, D. (2015). Alcohol use and binge drinking among women of childbearing age-United States, 2011-2013. *MMWR: Morbidity and mortality weekly report*, 64(37), 1042-1046.
- Ting, J. P. Y., Kastner, D. L., & Hoffman, H. M. (2006). CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nature Reviews Immunology*, 6(3), 183-195.
- Toga, A. W., Thompson, P. M., & Sowell, E. R. (2006). Mapping brain maturation. *Focus*.
- Vallés, S. L., Blanco, A. M., Pascual, M., & Guerri, C. (2004). Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain pathology*, 14(4), 365-371.
- Vetreno, R. P., Broadwater, M., Liu, W., Spear, L. P., & Crews, F. T. (2014). Adolescent, but not adult, binge ethanol exposure leads to persistent global reductions of choline acetyltransferase expressing neurons in brain. *PloS one*,9(11).
- Wang, Y., Krishnan, H. R., Ghezzi, A., Yin, J. C., & Atkinson, N. S. (2007). Drug-induced epigenetic changes produce drug tolerance. *PLoS Biol*, 5(10), e265.
- Whelan, R., Watts, R., Orr, C. A., Althoff, R. R., Artiges, E., Banaschewski, T., ... & Conrod, P. J. (2014). Neuropsychosocial profiles of current and future adolescent alcohol misusers. *Nature*, 512(7513), 185-189.
- Witt, E. D. (2010). Research on alcohol and adolescent brain development: opportunities and future directions. *Alcohol*, 44(1), 119-124.
- World Health Organization. Ageing, & Life Course Unit. (2008). *WHO global report on falls prevention in older age*. World Health Organization.
- Wozniak, J. R., & Muetzel, R. L. (2011). What does diffusion tensor imaging reveal about the brain and cognition in fetal alcohol spectrum disorders?. *Neuropsychology review*, 21(2), 133-147.
- Young, C., Roth, K. A., Klocke, B. J., West, T., Holtzman, D. M., Labruyere, J., ... & Olney, J. W. (2005). Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 20(2), 608-614.
- Zakhari, S. (2013). Alcohol metabolism and epigenetics changes. *Alcohol Res*,35(1), 6-16.
- Zhou, F. C., Balaraman, Y., Teng, M., Liu, Y., Singh, R. P., & Nephew, K. P. (2011). Alcohol alters DNA methylation patterns and inhibits neural stem cell differentiation. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(4), 735-746.
- Zou, J. Y., & Crews, F. T. (2014). Release of neuronal HMGB1 by ethanol through decreased HDAC activity activates brain neuroimmune signaling. *PloS one*, 9(2), e87915.
- Zou, J., & Crews, F. (2010). Induction of Innate Immune Gene Expression Cascades in Brain Slice Cultures by Ethanol: Key Role of NF-κB and Proinflammatory Cytokines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*,34(5), 777-789.