



## RESUMEN FINAL PROYECTO INVESTIGACIÓN

**EXPEDIENTE: (2018 I003)**

**TÍTULO DEL PROYECTO:** *Neuroinflamación y alteraciones en la plasticidad cerebral en adolescentes con abuso de alcohol: Diferencias de género, Biomarcadores y terapias*

**INVESTIGADOR PRINCIPAL:** Consuelo Guerri Sirera

**EQUIPO DE INVESTIGACIÓN (nombre y apellidos del resto del equipo de investigación):**

DNI	NOMBRE	TITULACIÓN	CARGO
74217847-K	Maria Pascual Mora	Dra en Farmacia	Investigador
44864863-M	Juan Ureña Peralta	Dra en Biológicas	Post-doctoral
48409912H	Rosa Lopez Hidalgo	Dra Biotecnología	Post-doctoral
	Frances Ibañez	Ldo Biotecnología	Pre-doctoral

**ENTIDAD BENEFICIARIA Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN:**

**Centro de Investigación Príncipe Felipe**

---

### **RESUMEN (1) (2):**

El abuso de alcohol por los jóvenes es un problema sanitario y social, ya que el consumo de alcohol por los jóvenes ocasiona graves alteraciones en la plasticidad cerebral que conllevan disfunciones en procesos de memoria y aprendizaje. Por tanto, el primer objetivo era responder a la pregunta, *de como se extiende la neuroinflamación en el cerebro y la búsqueda de biomarcadores que la puedan detectar en las fases iniciales*. Nuestros resultados demuestran la participación de pequeñas vesículas extracelulares (EVs) denominadas *exosomas* en la extensión de la neuroinflamación asociada con el abuso de alcohol. Además, estas EVs pueden atravesar la barrera hemato-encefálica y servir de biomarcadores plasmáticos de neuroinflamación. Para ello se analizaron el contenido de los EVs de cerebro y en plasma de animales (machos y hembras) y jóvenes (chicos/chicas) con o sin dosis agudas de alcohol. Demostramos que el abuso de alcohol en adolescentes disminuye los niveles plasmáticos de miRNAs anti-inflamatorios (mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p) en EVs de chicas y ratones hembra adolescentes, mientras que los mismos miRNAs incrementan en EVs de chicos y ratones macho, indicando diferencias de género en los efectos del alcohol (Ibañez et al, Int J, Mol Sci, 2020). El segundo objetivo era *evaluar el efecto del consumo intermitente de alcohol sobre la plasticidad neuronal en corteza cerebral y en el Nac/ATV*. Demostramos que el consumo de alcohol en la adolescencia altera la plasticidad de zonas cerebrales, incluyendo NAc e hipocampo y modifica ciertos factores de transcripción como CREB. Estos efectos se asocian con disfunciones miRNAs relacionados con neuroinflamación y procesos de memoria y aprendizaje en animales adultos. Estos efectos dependen de la activación de los

---



receptores del sistema inmunitario TLR4, ya que ratones carentes de este receptor no se observan los efectos del abuso de alcohol. Además, la administración de rapamicina, un inhibidor de quinasa mTOR y de la autofagia, antes de administrar el etanol a los animales, restaura tanto la plasticidad mediada por el consumo de alcohol como los algunos efectos adversos en las conductas de memoria. Los resultados sugieren el papel del mTOR en las modificaciones dendríticas y procesos de memoria y aprendizaje asociados al consumo intermitente de alcohol durante la adolescencia (Pascual et al., Brain Pathol.2021).

**ABSTRACT (English):** Alcohol abuse by young people is an important health and social problem, since alcohol consumption by teenagers can induce alterations in brain plasticity and memory and learning processes. Therefore, a question that we try to answer in this project is, how neuroinflammation spreads in the brain and the search for biomarkers that can detect it in the initial phases. We demonstrate the role of small extracellular vesicles (EVs) called exosomes in spreading the neuroinflammation associated with alcohol abuse. Likewise, since EVs can cross the blood-brain barrier and serve as plasma biomarkers of neuroinflammation, we have evaluated the content of EVs in the brain and plasma of young animals (males and females) and young people (boys/girls) with or without acute doses of alcohol were analyzed. We show that adolescent alcohol abuse decreases plasma levels of anti-inflammatory miRNAs (mir-146a-5p, mir-21-5p, mir-182-5p) in EVs from adolescent female mice and girls, while the same miRNAs are increased in EVs from boys and male mice, indicating gender differences in the effects of alcohol. (Ibañez et al, Int J, Mol Sci, 2020).

The **second objective** was to evaluate the effect of intermittent alcohol consumption on neuronal plasticity in the cerebral cortex and in the Nac/ATV. Our results show that alcohol consumption in adolescence alters the plasticity of brain areas, including NAC and hippocampus, as evidenced by changes in density and morphology of dendrites, as well as modifications in certain transcription factors such as CREB. These effects were associated with miRNA dysfunctions related to neuroinflammation and memory and learning processes, as demonstrated by the different behavioral tests that were analyzed. These effects were not observed in mice knocking out the TLR4 receptor (TLR4-KO). Administration of rapamycin, an inhibitor of mTOR kinase and autophagy, prior to administering ethanol to animals, restores both plasticity mediated by alcohol consumption and some adverse effects on memory behaviors. (Pascual et al., Brain Pathol.2021).

**PALABRAS CLAVE (3):** Abuso de alcohol, adolescencia, plasticidad cerebral, receptores TLR4, neuroinflamación, diferencias de género.

**KEY WORDS (English):**Alcohol abuse, adolescence, cerebral plasticity, TLR4 receptors, neuroinflammation, gender differences.

#### **JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO Y OBJETIVOS:**

El alcohol es la droga con un mayor consumo entre los más jóvenes, y aunque los planes de prevención son importantes, hay que buscar tratamientos efectivos para paliar los efectos del alcohol en aquellos jóvenes que hayan iniciado su consumo y presenten daños neurológicos o psicológicos. Por ello es imprescindible *profundizar en los mecanismos del daño que ocasiona en alcohol en cerebro y buscar nuevos tratamientos*. Hemos demostrado



que la neurotoxicidad del alcohol esta mediada por una activación de la respuesta del sistema neuroinmunitario y de los receptores TLR4, cuya activación causa neuroinflamación/daño cerebral y alteraciones cognitivas/conductuales en animales adolescentes con abuso alcohol. Estudios recientes indican la participación de pequeñas vesículas (VEs) que participan en la extensión de la neuroinflamación. Por tanto, el primer objetivo que fue evaluar el papel de los exosomas en la transmisión de la neuroinflamación en corteza cerebral y analizar su contenido en plasma de animales (machos y hembras) y jóvenes adolescentes (chicos/chicas) con o sin dosis agudas de alcohol, y se evaluar las posibles diferencias de genero y su papel como biomarcadores de neuroinflamación. El segundo objetivo fue evaluar son los mecanismos que causan alteraciones en la plasticidad en animales adolescentes con consumo de alcohol y que conllevan a disfunciones conductuales a largo plazo, así como la predisposición al abuso de alcohol. Mediante el uso de diferentes aproximaciones experimentales se analizará el efecto del alcohol en disfunciones de la plasticidad en la corteza prefrontal, nucleo acumbens (NAc) y área tegmental ventral (ATV) e evaluar la participacion de la a autofagia en la regulación de la plasticidad cerebral durante el desarrollo de cerebro.. Los resultados pueden conllevar, tanto a la detección temprana de la neuroinflamación, mediante el uso de biomarcadores en fases iniciales, como el desarrollo de tratamientos que puedan revertir los efectos del alcohol sobre la plasticidad cerebral y su relación con las disfunciones cognitivas y la predisposición al abuso de alcohol en el adulto.

#### PRINCIPALES RESULTADOS:

##### Objetivo 1

Nuestros resultados anteriores demuestran que los exosomas de células gliales son capaces de transmitir/extender la neuroinflamación en cerebro. La pregunta que nos planteamos fue, si los *exosomas* o vesículas extracelulares (EVs) de cerebro son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica y servir de biomarcadores de neuroinflamacion. En el presente proyecto demostramos que, el abuso de alcohol (botellón) disminuye los niveles de miRNAs anti-inflamatorios en EVs de plasma de chicos.

Utilizando animales experimentales, ratones macho y hembras, demostramos que el abuso de alcohol reduce los niveles de mRNAs anti-inflamatorios, (mir-146a-5p mir-21-5p, mir-182-5p) en corteza cerebral y en EVs de plasma de ratones hembra, y estos mismos niveles se reducen corteza cerebral y en EVs de plasma de ratones macho, sugiriendo que los EVs plasmáticos pueden ser biomarcadores de la neuroinflamación.

Estos resultados demuestran, por primera vez, que las hembras son más vulnerables que los machos a los efectos neuroinflamatorios del abuso de alcohol. Al mismo tiempo los resultados indican que los miRNAs en EVs pueden ser biomarcadores de neuroinflamación asociados con el abuso de alcohol en adolescentes (*Ibañez et al, Int J, Mol Sci, 2020*)

***Objetivo 2,:* El segundo objetivo proponía evaluar el efecto del consumo intermitente de alcohol sobre la plasticidad neuronal en corteza cerebral y en el Nac/ATV. Además, utilizando ratones WT y TLR4-KO, se pretendía evaluar tratamientos que reviertan el daño, mediante la utilización de la rapamicina que inhibe la mTOR y revierte la plasticidad cerebral**

Nuestros resultados previos demuestran que el consumo de alcohol en la adolescencia altera la plasticidad en corteza prefrontal. En el presente proyecto demostramos que el



abuso de alcohol en la adolescencia altera la densidad y morfología de las dendritas e induce modificaciones en ciertos factores de transcripción, como CREB en Nucleo accumbens e hipocampo. Estos efectos se asocian con disfunciones miRNAs asociados a neuroinflamación y en procesos de memoria y aprendizaje, según los demuestran los diferentes test de conducta que se analizaron. Sin embargo, ratones TLR4 (TLR4-KO) no poseen neuroinflamación ni afecta a la plasticidad cerebral, indicando el papel de la respuesta de los receptores TLR4 en la plasticidad cerebral. Estos efectos se pudieron prevenir con la administración de *rapamicina*, un inhibidor de quinasa mTOR y de la autofagia, ya que restaura tanto la plasticidad mediada por el consumo de alcohol como los algunos efectos adversos en las conductas de memoria. Estos resultados sugieren el papel de mTOR en las alteraciones dendríticas y en procesos de memoria y aprendizaje asociados con el consumo intermitente de alcohol durante la adolescencia. (*Pascual et al., Brain Pathol. 2021*)

Otro de los objetivos que hemos abordado ha sido analizar la diferencia entre los ratones WT y TLR4-KO ya que a estos últimos no les afecta las acciones del alcohol en cerebro. Para ello, utilizando datos de secuenciación masiva de cerebro de dichos animales, hemos analizado los mecanismos y los miRNAs en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO. Los resultados demuestran, que el abuso de alcohol altera muchos genes y miRNAs asociados con la neuroinflamación, pero los ratones carentes del receptor TLR4 no se observan cambios en estos miRNAs asociados con inflamación, lo que sugiere mecanismos de neuroinflamación mediados por la activación de los receptores TLR4 (*Ureña et al, Plos One, 2020*).

Tercer Objetivo Adicionalmente, los exosomas y las vesículas extracelulares (VEs) desempeñan un papel importante en la comunicación intracelular, y tanto el colesterol como la esfingomielinasa participan en la biología de las VEs, y las MAMs (mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranas) y en en la homeostasis del colesterol/sfingomielina de la membrana. Por tanto, hemos evaluado si las MAMs y la esfingomielinasas (SMases) participan en la mayor liberación de VEs inducida por el etanol. Los resultados demostraron que el etanol incrementa la secreción de VEs y su concentración en mediadores inflamatorios. Estos efectos que se asocian con incrementos de la actividad MAM, que altera el metabolismo lipídico, incrementando la captación de colesterol, su esterificación y la actividad esfingomielinasa (SMasa) en las membranas de células microgliales. Demostramos que la inhibición de la de la SMase o de la actividad MAM previene la secreción de las VEs inducida por el etanol. Los resultados sugieren que los lípidos de membrana y, específicamente, la activación de las SMases y MAM, podría explicar el aumento en la liberación de VEs inducida por el etanol en células gliales (*Ibañez et al. Inter. J. Int J, Mol Sc., 2021*)

**Conclusiones:** Los hallazgos principales del proyecto demuestran que el abuso de alcohol durante la adolescencia causa neuroinflamación, que esta mediada por la respuesta de los receptores TLR4. La activación de estos receptores se asocia con modificaciones en la plasticidad y maduración de la corteza cerebral en desarrollo, conduciendo a déficits en importantes en los procesos de memoria y aprendizaje. También demostramos que el alcohol causa alteraciones en los procesos de autofagia y en la eliminación de dendritas inmaduras, ya que la inhibición de este proceso restaura la plasticidad.

**4 Objetivo ( nuevo)** Adicionalmente hemos evaluado los efectos del abuso de alcohol sobre



*el microbioma intestinal y del sistema inmunitario.* Los resultados demuestran que el consumo/abuso de alcohol reduce la diversidad del microbioma y causa disbiosis en ratones WT. Así mismo, el abuso de alcohol incrementa la expresión de genes inflamatorios (IL-1 $\beta$ , iNOS, TNF- $\alpha$ ) y miRNAs (miR-155-5p, miR-146a-5p) alterando la estructura y permeabilidad (INTL1, CDH1, CFTR) en el colon de ratones silvestres o WT. Nuestros resultados también demuestran que los ratones TLR4-KO muestran una microbiota distinta, con un enriquecimiento de bacterias no patógenas y que protegen contra la activación del sistema inmune intestinal y las disfunciones en el colon. En resumen, demostramos que la activación del TLR4 es un factor importante y determinante en la disbiosis, alteraciones en la en el microbiota intestinal y la respuesta inflamatoria que induce el abuso de alcohol (Cuesta et al, Int J, Mol. Sci, 2021)

#### DISCUSIÓN:

##### APLICABILIDAD E IMPACTO SOCIO-SANITARIO DEL PROYECTO:

*Los resultados demuestran que el abuso de alcohol durante la adolescencia causa neuroinflamación y altera en plasticidad de s áreas cerebrales. Estos efectos pueden conllevar a bajos rendimientos académicos y a una predisposición al abuso del alcohol en el adulto.*

*El consumo de alcohol altera el microbioma intestinal que puede afectar también al cerebro*

##### SÍNTESIS DE LOS ASPECTOS MÁS RELEVANTES QUE APORTA EL ESTUDIO:

--Por primera vez, que las hembras son más vulnerables que los machos a los efectos neuroinflamatorios del abuso de alcohol. Al mismo tiempo los resultados indican que los miRNAs en EVs pueden ser biomarcadores de neuroinflamación asociados con el abuso de alcohol en adolescentes (Ibañez et al, Int J, Mol Sci, 2020).

-El abuso de alcohol durante la adolescencia altera la plasticidad cerebral, afectando los procesos de memoria y aprendizaje.

-Muchos de los efectos del abuso de alcohol en cerebro están mediados por alteraciones en el sistema innato inmunitario y de sus receptores TLR4 que causan neuroinflamación a afectan la conducta

##### ENLACES O REFERENCIAS PARA AMPLIAR INFORMACIÓN ACERCA DEL PROYECTO (en su caso):

##### PUBLICACIONES CIENTÍFICAS GENERADAS (4) (SI NO LO HA HECHO, LE ROGAMOS ENVÍE JUNTO CON ESTA FICHA **COPIA DE CADA UNO DE LOS TRABAJOS PUBLICADOS**)

*-Pascual M, Montesinos J and Guerri C Role of the innate immune system in the neuropathological consequences induced by adolescent binge drinking J Neuro Res.;96:765–780, 2018.*



---

-Jorge Montesinos, María Pascual, David Millán-Esteban, d, Consuelo Guerri. **Binge-like ethanol treatment in adolescence impairs autophagy and hinders synaptic maturation: Role of TLR4**, Neuroscience Letters 682. 85–91, 2018

-Francesc Ibáñez, Jorge Montesinos, Juan R. Ureña-Peralta, Consuelo Guerri and María Pascual. **TLR4 participates in the transmission of ethanol-induced neuroinflammation via astrocyte-derived extracellular vesicles**, Journal of Neuroinflammation 16:136, 2019

-María Pascual, Francesc Ibáñez, Consuelo Guerri **Exosomes as mediators of neuron-glia communication in neuroinflammation**, NEURAL REGENERATION RESEARCH;15(5):796-801, 2020

-Francesc Ibáñez 1, Juan R. Ureña-Peralta 1, Pilar Costa-Alba 2, Jorge-Luis Torres 3, Francisco-Javier Laso 3, Miguel Marcos 3, Consuelo Guerri 1 and María Pascual **Circulating MicroRNAs in Extracellular Vesicles as Potential Biomarkers of Alcohol-Induced Neuroinflammation in Adolescence: Gender Difference**, J. Mol. Sci. 21, 6730, 2020

-Ibáñez F, Montesinos J, Area-Gomez E, **Guerri C, Pascual M. Ethanol Induces Extracellular Vesicle Secretion by Altering Lipid Metabolism through the Mitochondria-Associated ER Membranes and Sphingomyelinases**, Int J Mol Sci. 22(16):8438. 2021

-Pascual M. Calvo-Rodriguez M, Nuñez L, Villalobos C, Urena J, Guerri C . **Toll-like receptors in neuroinflammation, neurodegeneration and alcohol-induced brain damage**. IUBMB Life.73(7):900-915,2021

- Cuesta CM, Ibañez F, Lopez-Hidalgo R, Ureña J, Duro-Castano A, Armíñán A, Vicent MJ, Pascual M, Guerri C. **A targeted polypeptide-based nanoconjugate as a nanotherapeutic for alcohol-induced neuroinflammation**. Nanomedicine. 34:102376, 2021

-Cuesta CM, Pascual M, Pérez-Moraga R, Rodríguez-Navarro I, García-García F, Ureña-Peralta JR, Guerri C - **TLR4 Deficiency Affects the Microbiome and Reduces Intestinal Dysfunctions and Inflammation in Chronic Alcohol-Fed Mice**. Int J Mol Sci.22(23):12830, 2021

#### **PRESENTACIÓN DE RESULTADOS (CONGRESOS, JORNADAS Y ACTIVIDADES DE DISEMINACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA): 2019**

-Seminario en Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, **El Alcohol como alimento, droga adictiva, teratógeno y compuesto neurotóxico/neuro-inflamatorio**. "7 de Septiembre 2019

- Congreso de la ESBRA ( European Society for Biomedical Research on Alcohol) Lille, Francia Ponencia en un simposio "**Glia-to-neuron transfer of inflammatory proteins and miRNAs via extracellular vesicles: A new mechanism underlying ethanol-induced**

---



---

**neuroinflammation. C. Guerri<sup>1</sup>.**

-Jornadas de Síndrome alcohólico fetal (SAF), Universidad autónoma de Barcelona, 5 de Abril. Ponencia a " *Trastornos del espectro alcohólico fetal: Efectos del alcohol durante las diferentes fases del desarrollo del cerebro y alteraciones en la conducta.*

-Charlas en diferentes 4 educativos " Abuso de Alcohol y adolescencia" octubre 2019 Murcia

-Ponente en la reunión sobre Alcoholism and Stress: A Framework for Future Treatment Strategies, May 5 - 8, 2020, Volterra, Italy. Ponencia "The role of TLR4 receptors and the modulatory role of miRNAs in ethanol-induced TLR4 response in brain and in glial cells exosomes"

Durante los años 2020 y 2021, aunque estaba de invitada en varios congresos no pude asistir por el COVID , aunque algunos los realice ON-Line

**PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD (en su caso) :**

**BIBLIOGRAFÍA (4):**

**COFINANCIACIÓN (APARTE DE LA DELGACIÓN DEL GOBIERNO PARA EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS), en su caso:**

Para el proyecto del PNSD no solicite otras ayudas económicas

**AGRADECIMIENTOS:**

**CONTACTO (dirección de correo electrónico para consultas al equipo de investigación):**

---

**NOTAS:**

(1): Este resumen está dirigido a dar a conocer los aspectos sustanciales de los proyectos financiados por la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas tanto a la población general como a profesionales, a través de su publicación en la página web del Ministerio de Sanidad. Procure ser conciso en las exposiciones. Incluya las gráficas y tablas que considere oportunas. En el caso de precisar otro tipo de información (audiovisuales, archivos de datos, etc.), consulte con el órgano instructor para valorar procedimiento de difusión.



MINISTERIO  
DE SANIDAD

DELEGACIÓN DEL GOBIERNO PARA  
EL PLAN NACIONAL SOBRE DROGAS

SUBDIRECCIÓN GENERAL DE  
COORDINACIÓN DE PROGRAMAS

(2): Máximo 500 palabras.

(3): Utilice como fuente el Medical Subjects Headings, MeSH, del Index Medicus.

(4) Se recomienda seguir los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas conforme a las normas de la US National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7250/>)