

AYUDAS ECONÓMICAS PARA EL DESARROLLO DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN 2014

Investigadora principal: GUERRI SIRERA, Consuelo

Nº de expediente: 2014I010

Entidad: FUNDACIÓN DE LA COMUNIDAD VALENCIANA CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRÍNCIPE FELIPE

Departamento: Centro de Investigación Príncipe Felipe

Tipo de investigación: BÁSICA

Nombre del proyecto: *Biomarcadores de neuroinflamación asociados al consumo de alcohol en adolescentes y nuevas terapias para paliar la neuroinflamación*

Número de anualidades: 3

1ª anualidad: 54.510

2ª anualidad: 26.915

3ª anualidad: 18.425

Total concedido: 99.850

RESUMEN DEL PROYECTO

Nuestros trabajos han contribuido a establecer que el cerebro en desarrollo es especialmente vulnerable a los efectos neurotóxicos del alcohol, y que el abuso de alcohol en menores/adolescentes induce daño neural y altera la plasticidad cerebral. Fuimos pioneros en desarrollar un modelo experimental de abuso de alcohol durante la adolescencia, que simulaba el botellón, y en demostrar que el abuso de alcohol durante esta fase de maduración del cerebro, causa daño en la corteza prefrontal por mecanismos de neuroinflamación, afectando a la plasticidad cerebral y causando disfunciones cognitivas y conductuales a largo plazo.

Así mismo, por primera vez demostramos que la neurotoxicidad del alcohol, tanto en los jóvenes como en el adulto, esta mediada por una activación de la respuesta del sistema inmunitario en cerebro, y en particular de los receptores TLR4. De hecho, el etanol es capaz de activar a los receptores del sistema inmunitario innato, TLR4 (receptores *Toll-like*), en células gliales, estimulando cascadas de señalización que conllevan a la liberación de citoquinas, quimiocinas y mediadores inflamatorios que causan daño neural por neuroinflamación y alteraciones conductuales. El papel de este receptor en los efectos neurotóxicos del etanol se demostró mediante la utilización de ratones deficientes en TLR4 (TLR4-KO), ya que estos animales estaban protegidos de la gliosis, aumento de citoquinas inflamatorias, alteraciones de la mielina, daño cerebral y de las disfunciones conductuales que causa el consumo crónico de alcohol en los ratones normales o WT.

Así mismo, la deficiencia de los TLR4 protege de las alteraciones en el desarrollo de la mielina y la plasticidad cerebral que causa el abuso de alcohol en la fase juvenil/adolescente en animales. Resultados recientes demuestran que la naloxona bloquea a los receptores TLR4 (Hutchinson et al., 2012), sugiriendo que la naloxona, y posiblemente el nalmefeno, podrían reducir la neuroinflamación asociada al consumo de alcohol. Basados en nuestros resultados experimentales y en evidencias clínicas que sugieren que el abuso de alcohol causa neuroinflamación y que posiblemente la naloxona o el nalmefeno podrían inhibir la neuroinflamación, la hipótesis que proponemos es que **el abuso de alcohol en menores causa daño en la corteza prefrontal, por mecanismos de neuroinflamación y activación de la respuesta de**

los receptores TLR4, induciendo liberación de citoquinas y quimiocinas en cerebro y en suero, que pueden ser biomarcadores de daño cerebral y conductual. La naloxona o el nalmefeno, fármacos que se dan en el tratamiento del alcoholismo, bloquean a los receptores TLR4 y por tanto a la neuroinflamación que causa el abuso de alcohol. Para abordar esta hipótesis los objetivos que proponemos son los siguientes:

- 1) Analizar mediante microarrays los niveles de varias citoquinas y quimiocinas en diferentes partes de cerebro y en suero de ratones adolescentes que han estado expuestos al etanol durante el periodo de la adolescencia. Se utilizarán ratones WT y TLR4-KO para evaluar los efectos del etanol mediados por estos receptores.
- 2) Las citoquinas y quimiocinas marcadoras de daño cerebral que se obtenga en animales experimentales, serán evaluadas en suero de jóvenes que llegan a urgencias con una intoxicación aguda.
- 3) Evaluar en células gliales en cultivo, si la naloxona o el nalmefeno bloquean la señalización del TLR4 y la liberación de citoquinas y quimiocinas al medio de cultivo, comparando el potencial de inhibición de ambos compuestos utilizando diferentes concentraciones.
- 4) En animales experimentales comprobar el potencial de la naloxona y el nalmefeno, en inhibir la respuesta de los receptores TLR4, y en prevenir la neuroinflamación, daño cerebral y liberación de citoquinas en plasma y en cerebro. Pensamos que los resultados pueden conllevar al establecimiento de biomarcadores plasmáticos de neuroinflamación en jóvenes para tratar de prevenir los daños irreversibles que causa el abuso de alcohol. Al mismo tiempo, pretendemos evaluar si la naloxona o el nalmefeno, además de reducir el consumo de alcohol, pueden mitigar la neuroinflamación y el daño asociado al consumo de alcohol.

OBJETIVOS

Los objetivos que se pretenden realizar son los siguientes:

- 1) En animales, ratones adolescentes a los que se les administra alcohol de forma intermitente una dosis elevada de alcohol, que simula el botellón durante los fines de semana, se analizará al final del tratamiento los niveles de varias citoquinas y quimiocinas en diferentes partes de cerebro y en suero. Se utilizarán ratones normales y TLR4-KO, para evaluar los efectos del etanol mediados por estos receptores.
- 2) Los niveles de citoquinas y quimiocinas marcadoras de daño cerebral que se obtenga en animales experimentales, se evaluarán en suero y en cDNA de sangre de jóvenes que llegan a urgencias con una intoxicación aguda. Este objetivo se realizará en colaboración con el Dr. Javier Laso y el Dr. Miguel Marcos, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca (RED-RTA).

- 3) Evaluar si la naloxona o el nalmefeno bloquean o inhiben la respuesta del TLR4 inducida por el alcohol o su ligando LPS. Este objetivo se realizará en cultivos primarios de microglía y astrogliá procedente de corteza cerebral de ratones. Se analizarán diferentes concentraciones de naloxona y nalmefeno para poder comparar su acción sobre estos receptores. Se evaluarán las cascadas de señalización asociadas a la respuesta del TLR4 como las MAPKs (p-ERK, p-p38, p-JNK) y los factores de transcripción NFκB. También se analizará la inducción y liberación de mediadores inflamatorios como citoquinas proinflamatorias, iNOS y COX-2. Finalmente se analizará la muerte celular y su prevención cuando las células se incuban con naloxona o el nalmefeno.
- 4) En animales experimentales adolescentes, comprobar el potencial inhibidor de la naloxona y el nalmefeno en la respuesta de los receptores TLR4 y la neuroinflamación/daño cerebral y liberación de citoquinas (suero y cerebro) inducida por la administración de alcohol de forma intermitente.

Pensamos que los resultados pueden conllevar al establecimiento de biomarcadores plasmáticos de neuroinflamación en jóvenes, para tratar de prevenir los daños irreversibles que causa el abuso de alcohol. Al mismo tiempo, pretendemos evaluar si la naloxona o el nalmefeno, además de reducir el consumo de alcohol, puede mitigar la neuroinflamación asociada al consumo de alcohol.

HIPÓTESIS

La hipótesis que proponemos es que ***el abuso de alcohol en menores causa daño en la corteza prefrontal, por mecanismos de neuroinflamación y activación de la respuesta de los receptores TLR4, induciendo liberación de citoquinas y quimiocinas en cerebro y en suero, que pueden ser biomarcadores de daño cerebral y conductual. La naloxona o el nalmefeno bloquean a los receptores TLR4, y por tanto a la neuroinflamación que causa el abuso de alcohol, además de reducir el ansia por su consumo. Es posible que ambos efectos estén mediados por la inhibición de los receptores TLR4, como se ha demostrado en los receptores opioides. (Hutchinson et al., 2012).***