

ALCOL E FATTORI DI CRESCITA NEURONALI

Sara De Nicolò (a), Rosanna Mancinelli (b), Valentina Carito (a), Paola Tirassa (a),
Marco Fiore (a), Mauro Ceccanti (c)

(a) *Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma*

(b) *Centro Nazionale Sostanze Chimiche, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Centro Riferimento Alcolologico Regione Lazio, "Sapienza" Università di Roma, Roma*

Introduzione

L'etanolo, conosciuto anche come alcol etilico, è una molecola organica costituita da una catena alifatica contenente due atomi di carbonio e un gruppo ossidrilico. L'etanolo è un anfotero a causa della presenza contemporanea della componente idrossilica ed etilica che gli conferiscono proprietà idrofile e lipofile.

L'alcol etilico è alla base di tutte le bevande alcoliche consumate dall'uomo, ed è considerato la sostanza d'abuso più diffusa al mondo, poiché il suo consumo è legalizzato in quasi tutti i Paesi del mondo.

Il consumo cronico e prolungato nel tempo di alcol porta all'insorgenza di una patologia nota come alcolismo. Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento di assunzione di alcol anche tra le giovani donne. Per questo motivo si ritiene che l'esposizione precoce all'alcol da parte della madre e il consumo di questa sostanza durante la gravidanza, sia una delle cause principali dell'induzione di malformazioni nei nascituri (1, 2).

L'esposizione in utero all'etanolo determina effetti teratogeni come il mancato sviluppo cerebrale e fisico del nascituro (3-5), e inoltre è la causa principale di un insieme di anomalie note come spettro di disordini fetto-alcolici o FASD (*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*). La forma più grave di tali anomalie è nota come sindrome fetto-alcolica o FAS (*Fetal Alcohol Syndrome*) identificata inizialmente come causa di ritardo mentale (6).

Questa patologia è caratterizzata da microcefalia, anomalie neurologiche e muscolo-scheletriche e varie forme di ritardo mentale (7-10), inoltre sono presenti difetti nell'apparato visivo, uditivo, riproduttivo e cardiocircolatorio (5, 11, 12). Gli individui affetti da FASD presentano un rischio maggiore di sviluppare problemi comportamentali, di apprendimento o psichiatrici; spesso sono anche più propensi a consumare sostanze illegali o ad abusare di alcol (13, 14).

FASD è una malattia ancora poco conosciuta, proprio per questo motivo e per l'assenza di informazioni adeguate alle gestanti, la sua incidenza è elevata; si parla di circa 9 bambini colpiti da FASD su 1000 nati nei paesi occidentali (15, 16).

Tra i fattori di rischio che contribuiscono all'insorgenza di FASD occorre menzionare la quantità di alcol assunta prima della gravidanza (circa il 50% delle gravidanze non sono pianificate ciò comporta un'esposizione precoce del feto all'alcol), il tempo di esposizione a questa sostanza (aumentando i giorni di esposizione all'alcol aumenta anche il rischio di sviluppare FASD) (4, 17), il consumo di alcuni farmaci, la componente genetica, le cure parentali pre- e post-natali (18), ma anche carenze nutrizionali di componenti essenziali (19). In quest'ultimo caso, fondamentale per un corretto sviluppo fetale e per contrastare lo stress ossidativo e la produzione di radicali liberi, è il consumo di alimenti ricchi di vitamine e antiossidanti di origine naturale come frutta, verdura e olio extra-vergine d'oliva (20).

Metabolismo dell'alcol: dalla madre al feto

Inizialmente, dopo essere stato ingerito, l'alcol è assorbito tramite diffusione passiva nello stomaco (20%), la restante parte nel duodeno (21), viene poi distribuito nei liquidi corporei (10).

La concentrazione ematica di etanolo dipende dalla gradazione alcolica e dalla quantità di bevanda ingerita, dalla velocità di assorbimento da parte dell'apparato digestivo e dall'attività degli enzimi che metabolizzano questa sostanza.

La sensibilità più o meno marcata all'etanolo è correlata anche al sesso del bevitore. Infatti, le donne, essendo fisicamente più minute degli uomini e dotate di un minor contenuto corporeo di acqua per chilogrammo di peso, risentono maggiormente degli effetti dell'alcol. Per questo motivo, a parità di dose alcolica della bevanda ingerita, le donne presentano nel flusso sanguigno una maggior concentrazione ematica di etanolo, poiché questa sostanza si distribuisce e si diluisce in un volume d'acqua inferiore rispetto a quello degli uomini (22, 23).

La velocità di distribuzione dell'etanolo verso i tessuti è parzialmente correlata alla loro vascolarizzazione, pertanto in organi molto irrorati (come cervello, fegato, polmoni e reni) l'equilibrio si instaura più rapidamente. L'etanolo è completamente metabolizzato e ossidato nel fegato in due fasi successive (10) e in minor misura nello stomaco, reni, polmoni e muscoli. Nella prima fase avviene una reazione di ossidazione mediata da un enzima citoplasmatico, l'alcol deidrogenasi, che trasforma l'etanolo in acetaldeide. Successivamente, nella seconda fase, avviene un'altra reazione di ossidazione da parte dell'aldeide deidrogenasi, che trasforma l'acetaldeide in acido acetico (2).

L'aumento della concentrazione di etanolo nel flusso sanguigno porta alla saturazione degli enzimi coinvolti con il metabolismo di questa sostanza. Esistono diversi enzimi deputati alla metabolizzazione dell'alcol; tra questi occorre citare la catalasi presente nei perossisomi, e il citocromo P450 nei microsomi (10, 24, 25). L'etanolo, a causa della sua solubilità, non si lega né alle proteine plasmatiche né a nessun tessuto, anzi entra rapidamente nel flusso sanguigno materno e per diffusione facilitata attraversa la barriera ematoencefalica e la placenta (26-28), e da qui si distribuisce al sistema circolatorio fetale (29). Pochi minuti dopo l'assunzione di una bevanda alcolica la concentrazione alcolemica nel sangue del feto e nel fluido amniotico è simile a quella della madre (4). A differenza dell'adulto, il feto non può metabolizzare l'alcol, poiché privo degli enzimi atti a questo compito. Di conseguenza, l'etanolo, ma soprattutto i suoi metaboliti come l'acetaldeide (10) si accumulano nel sistema nervoso e in altri organi, come il fegato, alterandone lo sviluppo (2, 25).

Etanolo e il sistema nervoso

Ultimamente, la risonanza magnetica nucleare è stata utilizzata per studiare in individui esposti precocemente all'etanolo le anomalie a livello cerebrale indotte da questa sostanza. Da questi studi è emersa una riduzione globale del volume cerebrale; in particolare le aree più colpite sono la corteccia prefrontale, il cervelletto e le strutture subcorticali e il sistema limbico in generale (30).

L'etanolo è considerato una sostanza stimolante, ma in realtà dal punto di vista farmacologico è stato classificato come un deprimente del sistema nervoso centrale. Gli effetti deprimenti dell'alcol sono i principali responsabili dell'effetto euforizzante e della disinibizione del comportamento (31). A dosi moderate provoca effetti ansiolitici, innalzamento della soglia del dolore e del freddo, aumento della componente inibitoria, una deplezione dei riflessi nocicettivi ed eccitatori e una riduzione della coordinazione motoria. A dosi tossiche porta

all'offuscamento della memoria, del giudizio, riduce i tempi di reazione e altera la percezione del pericolo. L'abuso cronico di alcol è mutagenico e carcinogenico (10, 25, 32) ed è associato all'induzione di varie patologie (25, 33, 34) i cui meccanismi d'insorgenza ancora non sono noti (25, 35).

Un effetto indiretto dell'alcol è l'ipossia fetale che potrebbe essere dovuta ad un danno indotto da questa sostanza sulla placenta e probabile causa del ritardo mentale, caratteristico degli individui affetti da FAS (36, 37). La placenta, è essenziale per il metabolismo e crescita fetale, trasporta tutte le sostanze nutritive ed elimina anidride carbonica e metaboliti tossici. La placenta produce normalmente specie reattive all'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), ma questa produzione in caso di patologie, come preeclampsia, diabete pre-gestazionale (38) o consumo di alcol (39), è notevolmente incrementata. L'assenza di ossigeno nel cervello del feto potrebbe essere dovuta alla diminuzione di flusso sanguigno al cordone ombelicale (probabilmente regolato dall'ossido nitrico (NO) i cui livelli di produzione sono ridotti in seguito dell'esposizione all'alcol) (27) e all'aumento dello stress ossidativo nei villi della placenta (40). È stato osservato che l'etanolo somministrato in forma acuta inibisce i recettori NMDA (N-metil-D aspartato) (41). In forma cronica causa una regolazione adattativa di questi stessi recettori nella corteccia cerebrale e nell'ippocampo, e un aumento di vulnerabilità alla risposta citotossica indotta dal glutammato (esotossicità indotta) (41, 42), ciò potrebbe spiegare l'ipereccitabilità osservabile durante i fenomeni di astinenza (43). L'aumento del flusso di calcio attraverso i recettori NMDA potenzierebbe ulteriormente la produzione dei ROS nel cervello e nel fegato (25, 44-46). In età adulta, l'abuso di alcol sembrerebbe essere responsabile della neurodegenerazione di popolazioni neuronali in diverse aree cerebrali, soprattutto dell'ippocampo (25, 47), e di conseguenza potrebbe interferire con i processi di apprendimento e memoria (10). La morte dei neuroni sarebbe dovuta ad una disregolazione dei fattori di crescita e in questo caso l'alcol sarebbe il diretto responsabile della morte dei neuroni (48-50).

Neurotrofine e i fattori trofici: caratteristiche generali

Le neurotrofine sono delle molecole segnale appartenenti alla vasta famiglia dei fattori di crescita, della quale fanno parte l'NGF (*Nerve Growth Factor*) e il BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), NT-3 (neurotrofina 3), NT4-5 e NT-6 (35, 51, 52). Questi polipeptidi influenzano la sopravvivenza e lo sviluppo dei neuroni del sistema nervoso centrale e periferico (53), sono prodotte e rilasciate da vari tipi cellulari localizzati sia nel sistema nervoso (centrale e periferico), sia nel sistema endocrino e immunitario (35, 50, 54).

È stato dimostrato che l'assunzione cronica e/o acuta di etanolo può alterare la sintesi e il rilascio di neurotrofine come l'NGF e il BDNF (49,50). Questa stessa modificazione viene riscontrata anche nelle donne che durante la gravidanza e/o l'allattamento hanno fatto uso di bevande alcoliche causando l'insorgenza di FASD nel nascituro (36).

L'NGF fu il primo fattore di crescita ad essere scoperto e fu purificato la prima volta dalle ghiandole salivari di topi maschi (52, 55, 56). Questa proteina nella forma matura pesa 26 kDa (52) ed è prodotta dai neuroni colinergici, GABAergici, cellule cromaffini, oltre che dalle cellule del sistema immunitario ed endocrino (51, 52, 56).

Il BDNF fu purificato la prima volta dal cervello di maiale come un fattore di sopravvivenza e mantenimento dei neuroni sensoriali, dei gangli della retina, dei neuroni colinergici e motori spinali e dopaminergici (52, 57, 58). È una proteina omodimerica e pesa 28 kDa, è formato da 2 foglietti β antiparalleli, contenenti un cluster di cisteina (59). La produzione di BDNF nell'ippocampo e nella corteccia è fondamentale per consentire la plasticità sinaptica, inoltre rafforza o demolisce le connessioni neuronali (con conseguente aumento o diminuzione della

formazione di sinapsi e spine dendritiche) facilitando la sintesi e il consolidamento di nuovi ricordi (tramite il meccanismo del potenziamento a lungo termine) (52, 60) e i processi di apprendimento e memoria (61). Il BDNF è coinvolto anche con disturbi psichiatrici come depressione, stress, ansia e abuso di droghe (60).

Durante l'embriogenesi e l'organogenesi, le neurotrofine promuovono la sopravvivenza, la differenziazione neuronale, stimolano la crescita assonale, partecipano alla formazione delle sinapsi e contrastano la morte per apoptosi di sottopopolazioni neuronali specifiche (62). La sopravvivenza neuronale sembra dipenda non da un singolo fattore di crescita ma da fattori multipli, che possono appartenere alla stessa o a diverse famiglie di fattori di crescita (63). I fattori neurotrofici interagiscono con proteine recettoriali transmembranalmente dotate di un dominio extracellulare a cui si legano i fattori trofici e di un dominio citosolico sede dell'attività regolatoria e catalitica tirosinchinasica (64). I recettori dell'NGF e del BDNF appartengono alla classe dei recettori Trk (*Tropomyosin-kinase receptors*), mentre il p75 alla classe dei TNFr (*Tumor Necrosis Factor receptors*). L'NGF si lega al TrkA, il BDNF e l'NT-4 al TrkB, l'NT-3 al TrkC (52, 58, 65). Le neurotrofine si legano a un tipo specifico di recettore Trk, ma tutte possono anche legarsi al p75. Questo recettore aumenterebbe la possibilità della neurotrofina di legarsi al suo specifico recettore. Tutti i meccanismi mediati dai recettori (differenziazione, sopravvivenza, morte cellulare, infiammazione) sono ovviamente correlati all'attivazione dei recettori Trk e p75, ma anche a tutti i percorsi intracellulari che si innescano e sono ad essi associati. Il dominio citoplasmatico dei Trk contiene molte tirosine che fanno da substrato per la fosforilazione del recettore stesso. Quando avviene il legame tra neurotrofina e recettore i residui di tirosina vengono fosforilati; si forma così il core del sito di legame per proteine adattatrici ed enzimi che mediano la cascata di segnale intracellulare. I principali percorsi intracellulari attivati dai recettori Trk sono Ras, PI3-chinasi (66), PLC- γ 1 e i loro effettori successivi (65). La risposta attivata dal legame tra ligando (fattore di crescita) e il suo recettore (Trk e/o p75) giunge ai neuroni tramite meccanismi paracrini e autocrini (62).

Modelli animali di FASD

I roditori sono stati ampiamente utilizzati come modelli efficaci di esposizione prenatale all'alcol per comprendere in che modo questa sostanza possa indurre alterazioni all'organismo sia durante la fase embrionale, l'adolescenza e l'età adulta. Il ciclo vitale breve di questi animali si presta bene allo studio degli effetti dell'alcol poiché hanno un periodo di crescita e riproduzione relativamente rapido, ed è dunque possibile avere più generazioni in breve tempo. Se l'alcol viene somministrato nei 10 giorni finali della gestazione murina, equivalente al terzo periodo di gestazione umana una fase di elevata vulnerabilità ai danni dell'alcol (67-69) si assiste ad una cospicua riduzione delle cellule neurali a causa di anomalie nella proliferazione e nella sopravvivenza delle cellule neurali progenitrici e della glia (70). In generale, l'effetto globale è la riduzione del volume cerebrale della prole esposta precocemente all'etanolo (71).

Gli studi animali su FASD hanno dimostrato come i deficit di attenzione, l'iperattività (72, 73), l'aumento della risposta agli stimoli sensoriali (74) sono il risultato dell'esposizione prenatale all'alcol. Naassila *et al.* hanno intossicato ratti Wistar tramite inalazione di vapore di etanolo dimostrando che alcune regioni del cervello sono più sensibili di altre agli effetti dell'etanolo (75). L'esposizione cronica all'etanolo modifica l'espressione del gene NOS1 (ossido nitrico sintasi di tipo 1), un enzima che sintetizza, a partire dalla L-arginina, l'ossido nitrico (NO) (76), un neurotrasmettitore prodotto in risposta all'attivazione dei recettori NMDA (77). È stato dimostrato che non tutte le aree cerebrali sono sensibili all'alcol alla stessa maniera, infatti, nell'ippocampo i livelli mRNA codificanti per NOS1 diminuiscono dopo

l'esposizione cronica all'etanolo, mentre si assiste all'incremento di sintesi di NOS1 nello striato ma non nella corteccia frontale. Questo dimostra che l'ippocampo è molto più sensibile all'etanolo rispetto alle altre aree cerebrali analizzate. Ancora non è noto quale sia la quantità di etanolo che regoli l'espressione di NOS1. Probabilmente l'esposizione cronica all'alcol potrebbe deregolare la sintesi di NOS1 durante le fasi pre e post-trascrizionali, oppure il suo assemblaggio enzimatico. I risultati suggeriscono che NOS1 giochi un ruolo fondamentale nel determinare la tolleranza, la dipendenza e l'astinenza all'etanolo e dunque potrebbe essere sfruttato come bersaglio terapeutico per lo sviluppo di farmaci per la cura dell'intossicazione e la dipendenza da alcol (78).

Dati sperimentali provenienti da primati, soprattutto macachi, mostrano come gli effetti dell'alcol prima della nascita risultano tossici già a dosi moderate (equivalenti a circa due bicchieri al giorno per una donna). Nei primati, è stato dimostrato che gli effetti più gravi, come aborti o alterazioni comportamentali o strutturali, sono dovuti a una somministrazione eccessiva di etanolo prima della nascita (maggiore di circa 200 mg/dL), oppure quando il feto in fase di sviluppo è stato esposto sia a questa sostanza sia a stress prenatale (79). I dati ottenuti dagli animali impieganti nella sperimentazione e quelli provenienti dagli uomini hanno mostrato come a causa delle predisposizioni genetiche alcuni individui sono molto più suscettibili di altri ai danni indotti dall'esposizione prenatale dell'etanolo (80). La ricerca sui primati, se pur notevolmente più complessa e economicamente dispendiosa rispetto a quella effettuata sui roditori, sembra essere quella che più si avvicina a chiarire i meccanismi tossici indotti dal consumo di etanolo durante la gestazione (81). È stata posta l'attenzione anche sugli effetti che il consumo di etanolo produce nella madre. I comportamenti materni sono stati studiati utilizzando i ratti (82). I ricercatori suggeriscono che l'alterazione del comportamento della prole possa essere dovuto ad un cambiamento del comportamento materno a seguito dell'ingestione prolungata di alcol, oppure ad effetti sinergici dati dagli effetti teratogeni e anomalie nel comportamento della gestante. Il comportamento materno alterato potrebbe essere dovuto a cambiamenti nel cervello oppure dei livelli degli ormoni (81, 83).

Interazione tra etanolo e le neurotrofine in caso di FASD

Negli ultimi anni, a causa del crescente consumo di alcol e dei problemi ad esso correlati, i lavori scientifici che mettono in relazione questa sostanza e i suoi effetti, a livello metabolico e organico, sono notevolmente aumentati. I danni da alcol possono essere dovuti a diversi meccanismi cellulari (84) e possono colpire ogni tessuto o organo. L'esposizione alcolica in gravidanza è neurotossica per i neuroni corticali, neuroni ipotalamici, neuroni ippocampali e granulari del giro dentato, neuroni del bulbo olfattivo (84, 85) e soprattutto per le cellule del Purkinje (68, 86); queste ultime sono particolarmente vulnerabili alla neuropatologia da alcol come è emerso da studi condotti sull'uomo (87) e sui roditori (88). Miller e collaboratori hanno dimostrato come, nei ratti adolescenti e adulti, la neurogenesi dei precursori dei neuroni granulari dell'ippocampo sia ridotta o inibita a causa dell'esposizione precoce all'etanolo. Un meccanismo simile potrebbe avvenire in gravidanza durante lo sviluppo ippocampale (84). I danni da alcol possono essere dovuti a diversi meccanismi cellulari (89) e possono colpire ogni tessuto o organo. Uno di questi meccanismi comporta l'alterazione nella sintesi dei fattori trofici. È infatti stato accertato che l'alcol interferisce con il normale sviluppo cerebrale riducendo il numero di cellule che sintetizzano le neurotrofine e compromettendo l'utilizzazione delle stesse. Nei ratti è stata osservata una diminuzione della vitalità delle cellule che producono

BDNF (90) La riduzione di questa neurotrofina potrebbe essere dovuta ad una diminuzione del numero di cellule che sintetizzano BDNF oppure ad anomalie durante la trascrizione.

La nostra attività di ricerca si è appunto concentrata sulla comprensione della relazione che intercorre tra somministrazione cronica nei topi femmine gravide e gli effetti che l'alcol produce nella sintesi delle neurotrofine nella prole.

Il nostro campo di studi riguarda in particolar modo le interazioni tra l'etanolo e sistema nervoso centrale. I tessuti di indagine analizzati nei nostri esperimenti sono l'ippocampo, l'ipotalamo, la corteccia, il fegato, i reni, gli stessi che risultano maggiormente colpiti e alterati nei consumatori abituali d'alcol o negli individui affetti da FASD. Alle mamme gravide è stato somministrato etanolo per via orale sotto forma di soluzione alcolica all'11% oppure sotto forma di vino rosso a stessa concentrazione alcolica per tutto il periodo della gravidanza e in parte durante l'allattamento per imitare un consumo cronico continuo di alcol nella donna mamma alcolista. Il vino rosso è stato considerato perché soprattutto nei paesi dell'area mediterranea rappresenta la bevanda alcolica più comune consumata abitualmente. Dai risultati ottenuti (Figura 1) abbiamo dimostrato che negli animali giovani (7 giorni) esposti all'etanolo prima della nascita i fattori di crescita nell'ippocampo e nella corteccia diminuiscono a causa della loro minor sintesi (50); fenomeno simile si osserva negli animali adulti (30 giorni) (45). Questo cambiamento nella sintesi delle neurotrofine, nel gruppo trattato con etanolo, è anche associato ad una diminuzione delle cellule positive alla ChAT (acetilcolin-transferasi) sia nel setto e sia nei Nuclei Basali (50). Tuttavia, nei topi anziani (18 mesi) esposti in fase prenatale e durante l'allattamento ad etanolo si osserva un aumento della presenza della proteina NGF e della proteina BDNF nell'ippocampo e corteccia (91).

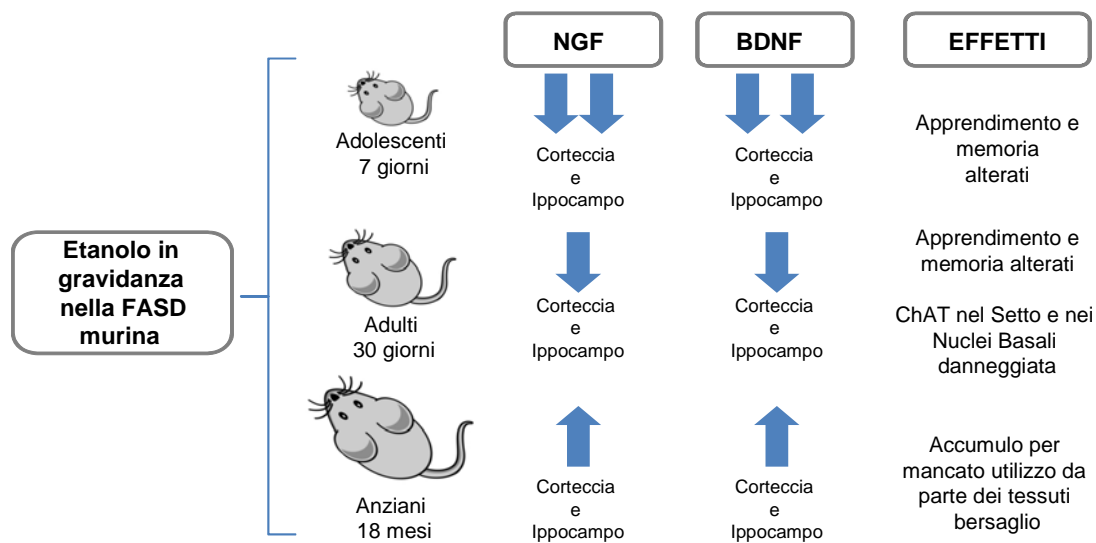


Figura 1. Effetti su NGF e BDNF dovuti alla somministrazione di etanolo durante la gravidanza in relazione all'età della prole: diminuzione (freccia in basso) e aumento (freccia in alto)

Questo dato è stato interpretato e discusso come un mancato utilizzo delle neurotrofine da parte dei tessuti dell'animale anziano. A sostegno di questa ipotesi ci sono dati anche nell'uomo che dimostrano come durante l'invecchiamento l'NGF e il BDNF tendono ad accumularsi per il mancato utilizzo da parte dei tessuti bersaglio nelle malattie neurodegenerative per la mancata

presenza e supporto dei recettori per l'NGF e/o il BDNF (50). Inoltre, abbiamo anche dimostrato come nella tiroide, nelle ghiandole surrenali e nei testicoli di topi anziani esposti all'etanolo durante la gravidanza la sintesi dell'NGF e del BDNF è aumentata. Perciò si ritiene che la somministrazione precoce di etanolo può indurre cambiamenti rilevanti nella sintesi delle neurotrofine anche nel sistema endocrino murino (dati ancora non pubblicati). La somministrazione acuta di etanolo potrebbe anche alterare l'espressione del mRNA per il BDNF in varie regioni del cervello associate allo sviluppo della dipendenza da alcol e altre sostanze d'abuso come la corteccia frontale, nucleo accumbens, nell'ippocampo, e nell'amigdala (92).

I dati ottenuti nei topi esposti prenatalmente al vino rosso sono in parte differenti a quelli esposti a soluzione alcolica normale. I risultati ottenuti dimostrano che a livello del sistema nervoso centrale l'effetto tossico nel topo risulta essere minore mentre in altri organi periferici bersaglio come il fegato l'effetto tossico dell'etanolo è simile. Tale effetto protettivo sui danni da etanolo del vino rosso a livello del sistema nervoso centrale (ma non per altri organi bersaglio come il fegato) è probabilmente da ricercare nei suoi stessi componenti (50). Questa bevanda, infatti, contiene elevate concentrazioni di sostanze con capacità antiossidante come polifenoli, tannini e antociani, tra cui il più noto è il resveratrolo, che potrebbero contribuire a limitare il danno indotto dall'etanolo (45, 50, 93). In ogni caso, l'unica considerazione da fare durante la gravidanza e l'allattamento è quella di smettere completamente di assumere bevande alcoliche di ogni tipo, anche quelle contenenti composti antiossidanti come il vino rosso. Tale considerazione di cessare il consumo di bevande alcoliche deve essere fatta anche per le donne che prevedono una gravidanza nel periodo precedente il concepimento.

Bibliografia

1. Randall V, Cervenka J, Arday D, Hooper T, Hanson J. Prevalence of life-threatening conditions in children. *Am J Hosp Palliat Care* 2011;28(5):310-15.
2. Shankar K, Ronis MJ, Badger TM. Effects of pregnancy and nutritional status on alcohol metabolism. *Alcohol Res Health* 2007;30(1):55-9.
3. Wells PG, Callum GP, Chen CS. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 2009;108:4-18.
4. Painter A, Andrew D, Burd L. Fetal alcohol spectrum disorders- implications for child neurology. Part I: Prenatal exposure and dosimetry. *J Child Neurol* 2012;27(2):258-63.
5. Bosco C, Diaz E. Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. *Alcohol Alcohol* 2012;47(2):109-17.
6. Abel EL, Sokol RJ. Incidence of fetal alcohol syndrome and economic impact of FAS-related anomalies. *Drug Alcohol Depend* 1987;19(1):51-70.
7. Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 1973;302:999-1001.
8. Mancinelli R, Ceccanti M, Laviola G. Fetal alcohol spectrum disorders (FASD): from experimental biology to the search for treatment. *Neurosci Biobehav* 2007;31:165-7.
9. Ikonomidou C. Triggers of apoptosis in the immature brain. *Brain & Development* 2009;31:488-92.
10. Manzo-Avalos S, Saavedra- Molina A. Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health* 2010;7:4281-304.
11. Sardor GG, Smith DF, MacLeod PM. Cardiac malformations in the fetal alcohol syndrome. *J Pediatr* 1981;98:771-3.

12. Terrapon M, Schneider P, Friedli B. Aortic arch interruption type A with aortopulmonary fenestration in an offspring of chronic alcoholic mother ('fetal alcohol syndrome'). *Helv Paediatr Acta* 1977;32:141-8.
13. Famy C, Streissguth AP, Unis AS. Mental illness in adults with fetal alcohol syndrome or fetal alcohol effects. *Am J Psychiatry* 1998;155:552-4.
14. Kane CJM, Phelan KD, Drew PD. Neuroimmune mechanisms in fetal alcohol spectrum disorder. *Dev Neurobiol* 2012;72(10):1302-16.
15. Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene P, Hanson JW, Graham JM Jr. Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology* 1997;56(5):317-26
16. O'Leary CM. 2004. Fetal alcohol syndrome: diagnosis, epidemiology, and developmental outcomes. *J Paediatr Child Health* 2004;40(1-2):2-7.
17. Streissguth AP, Sampson PD, Barr HM. Neurobehavioral dose-response effects of prenatal alcohol exposure in humans from infancy to adulthood. *Ann NY Acad Sci* 1989;562:145-58.
18. Abel EL, Hannigan, JH. Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: provocative and permissive influences *Neurotoxicol Teratol* 1995;17(4):445-62.
19. Miller SI, Del Villano BC, Flynn A, Krumhansl M. Interaction of alcohol and zinc in fetal dysmorphogenesis. *Pharmacol Biochem Behav* 1983;18(1):311-5.
20. De Nicoló S, Tarani L, Ceccanti M, Maldini M, Natella F, Vania A, Chaldakov GN, Fiore M. Effects of olive polyphenols administration on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the mouse brain. *Nutrition* 2013;29(4):681-7.
21. Norberg A, Jones AW, Hahn RG, Gabrielsson JL. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: research and forensic applications. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(1):1-31.
22. Wilsnack RW, Vongeltanz ND, Wilsnack SC, Harris TR. Gender differences in alcohol consumption and adverse drinking consequences: cross-cultural patterns. *Addiction* 2000;95(2):251-65.
23. Nolen-Hoeksema S. Gender differences in risk factors and consequences for alcohol use and problems. *Clin Psychol Rev* 2004;24:981-1010.
24. Deng XS, Deitrich RA. Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Curr Drug Abuse Rev* 2008;1(1):3-8.
25. Kruman I, Henderson I, Bergeson S. DNA damage and neurotoxicity of chronic alcohol abuse. *EBM* 2012; 237(7):740-1.
26. Streissguth AP, Landersman-Dwyer S, Martin JC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980;209(4454):353-61.
27. Jones PJ, Leichter J, Lee M. Placental blood flow in rats fed alcohol before and during gestation. *Life Sci* 1981;29(11):1153-9.
28. Miller MW. Effects of alcohol on the generation and migration of cerebral cortical neurons. *Science* 1986; 233(4770):1308-11.
29. Waltman, R., Iniquez, ES. Placental transfer of ethanol and its elimination at term. *Obstet and Gynecol* 1972;40(2):180-5.
30. Levi-Montalcini R, Aloe L, Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune system. *Prog Neurol Endocrinol Immunol* 1990;3:1-10.
31. Agarwal DP, Goedde HW. Pharmacogenetics of alcohol metabolism and alcoholism. *Pharmacogenetics* 1992;2(2):48-62.
32. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakilas AG. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res* 2011;711(1-2):193-201.

33. Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21(6):1073-82.
34. Harper C, Matsumoto I. Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5(1):73-8.
35. Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems. *Rev Neurosci* 2009;20(2):133-45
36. Abel EL. Prenatal effects of alcohol. *Drug Alcohol Depend* 1984;14(1):1-10.
37. Abel EL. Prenatal effects of alcohol on growth: a brief overview. *Fed Proc* 1985;44(7):2318-22.
38. Webster RP, Roberts VH, Myatt L. Protein nitration in placenta: functional significance. *Placenta* 2008;29:985-94.
39. Ornoy A. Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy. *Reprod Toxicol* 2007;24(1):31-41.
40. Kay HH, Grindle KM, Magness RR. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(3):682-8.
41. Carpenter-Hyland EP, Chandler LJ. Adaptive plasticity of NMDA receptors and dendritic spines: implications for enhanced vulnerability of the adolescent brain to alcohol addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;86(2):200-8.
42. Krystal JH, Petrakis IL, Mason G, Trevisan L, D'Souza DC. N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and alcoholism: reward, dependence, treatment, and vulnerability. *Pharmacol Ther* 2003;99(1):79-94.
43. Gulya K, Grant KA, Valverius P. Brain regional specificity and time-course of changes in the NMDA receptor-ionophore complex during ethanol withdrawal. *Brain Res* 1991;547(1):129-34.
44. Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007;7(8):599-612.
45. Fiore M, Mancinelli R, Aloe L, Laviola G, Sornelli F, Vitali M, Ceccanti M. Hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor, glial cell-derived neurotrophic factor and nerve growth factor are differentially affected by early chronic ethanol or red wine intake. *Toxicol Lett* 2009;188(3):208-13.
46. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011;26(1):30-46.
47. Obeiner JA, Bouldin TW, Crews FT. Binge Ethanol exposure in adult rats causes necrotic cell death. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26(4):547-57.
48. Feng M J, Yan SE, Yan QS. Effects of prenatal alcohol exposure on brain-derived neurotrophic factor and its receptor tyrosine kinase B in offspring. *Brain Research* 2005;1042(2):125-32.
49. Aloe L. Alcohol intake during prenatal life affects neuroimmune mediators and brain neurogenesis. *Ann Ist Super Sanità* 2006;42(1):17-21.
50. Fiore M, Laviola G, Aloe L, di Fausto V, Mancinelli R, Ceccanti M. Early exposure to ethanol but not red wine at the same alcohol concentration induces behavioral and brain neurotrophin alterations in young and adult mice. *Neurotoxicology* 2009;30(1):59-71.
51. Aloe L. Rita Levi-Montalcini and the discovery of NGF, the first nerve cell growth factor. *Arch Ital Biol* 2011;149(2):175-81.
52. Allen SJ, Watson JJ, Shoemark KD, Barua NU, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 2013;138(2):155-75.
53. Levi-Montalcini R. Nerve growth factor thirty-five years later. *EMBO J* 1987;6(5):1145-54.

54. Levi-Montalcini R, Aloe L, Alleva E. A role for nerve growth factor in nervous, endocrine and immune system. *Prog Neurol Endocrinol Immunol* 1990;3:1-10.
55. Aloe L, Alleva E, Bohm A, Levi-Montalcini R. Aggressive behavior induces release of nerve growth factor from mouse salivary gland into the bloodstream. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(16):6184-7.
56. Aloe L, Chalidakov GN. Homage to Rita Levi-Montalcini, the queen of modern neuroscience. *Cell Biol Int* 2013; doi:10.1002/cbin.10098.
57. Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian *Brain*. *EMBO J* 1982;1(5):549-53.
58. Davis MI. Ethanol- BDNF interactions: Stil more questions than answers. *Pharmacol Ther* 2008;118(1):36-57.
59. Van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibáñez CF, Geraerts WP, Bulloch AG. Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J* 1998;17(9):2534-42.
60. Hauser SR, Getachew B, Taylor ER, Tizabi Y. Alcohol induced depressive-like behavior is associated with a reduction in hippocampal BDNF. *Pharmacol Biochem Behav* 2011;100(2):253-8.
61. Aloe L, Alleva E, Fiore M. Stress and nerve growth factor: findings in animal models and humans. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73(1):159-66.
62. Davies AM. Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J* 2003;22(11):2537-45.
63. Snyder JS, Kee N, Wojtowicz JM. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. *J Neurophysiol* 2001;85(6):2423-31.
64. Ibáñez CF. Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1998;21(10):438-44.
65. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 2003;72:609-42.
66. Sornelli F, Lambiase A, Mantelli F, Aloe L. NGF and NGF-receptor expression of cultured immortalized human corneal endothelial cells *Mol Vis* 2010;16:1439-47.
67. West JR. Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. *Alcohol Drug Res* 1987;7(5-6):423-41.
68. Napper RMA, West JR. Permanent neuronal cell loss in the cerebellum or rats exposed to continuous low blood alcohol levels during the brain growth spurt: a stereological investigation. *J Comp Neurol* 1995;362(2):283-92.
69. Maier SE, Chen WJ, Miller JA *et al*. Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability regional differences in alcohol-induced microcephaly as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during rat brain development. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1418-28.
70. Cameron RS, Rakic P. Identification of membrane proteins that comprise the plasmalemmal junction between migrating neurons and radial glial cells. *J Neurosci* 1994;14:3139-55.
71. O'Leary-Moore SK, Parnell SE, Lipinski RJ, Sulik KK. Magnetic resonance-based imaging in animal models of fetal alcohol spectrum disorder. *Neuropsychol Rev* 2011;21(2):167-85.
72. Nanson, JL, Hiscock M. Attention deficits in children exposed to alcohol prenatally. *Alcohol Clin Exp Res* 1990;14(5):656-61.
73. O'Malley KD, Nanson J L. Clinical implications of a link between fetal alcohol spectrum disorder and attention-deficit hyperactivity disorder. *Can J Psychiatry* 2002;47(4):349-54.
74. Schneider ML, Moore CF, Gajewski LL, Larson JA, Roberts AD, Converse AK. Sensory processing disorder in a primate model: evidence from a longitudinal study of prenatal alcohol and prenatal stress effects. *Child Dev* 2008;79(1):100-13.

75. Vilpoux C, Warnault V, Pierrefiche O, Daoust M, Naassila M. Ethanol-sensitive brain regions in rat and mouse: a cartographic review, using immediate early gene expression. *Alcohol Clin Exp Res* 2009;33(6):945-69.
76. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H, Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994;23(6):1121-31.
77. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995;57:683-706.
78. Naassila M, Pierrefiche O, Beaugé FJ, Sébire N, Daoust M. Chronic ethanol exposure differentially regulates NOS1 mRNA levels depending on rat brain area. *Neurosci Lett* 2003;6:338(3):221-4.
79. Schneider ML, Colleen F, Adkins M, Adkins MM. The effects of prenatal alcohol exposure on behavior: rodent and primate studies. *Neuropsychol Rev* 2011;21(2):186-203.
80. Schneider ML, Roughton EC, Lubach GR. Moderate alcohol consumption and psychological stress during pregnancy induces attention and neuromotor impairments in primate infants. *Child Dev* 1997;68(5):747-59.
81. Kelly SJ, Goodlett CR, Hannigan JH. Animal models of fetal alcohol spectrum disorders: impact of the social environment. *Dev Disabil Res Rev*. 2009;15(3):200-8.
82. Fleming AS, O'Day DH, Kraemer GW. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neurosci Biobehav Rev* 1999;23(5):673-85.
83. Wilson JH, Kelly SJ, Wilson MA. 1996. Early postnatal alcohol exposure in rats: maternal behavior and estradiol levels. *Physiol Behav* 1996;59(2):287-93.
84. Miller MW. Generation of neurons in the rat dentate gyrus and hippocampus: Effects of prenatal and postnatal treatment with ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19(6):1500-9.
85. Bonthius DJ, Bonthius NE, Napper RMA, West JR. Early postnatal alcohol exposure acutely and permanently reduces the number of granule cells and mitral cells in the rat olfactory bulb: a stereological study. *J Comp Neurol* 1992;324(4):557-66.
86. Pierce DR, Goodlett CR, West JR. Differential neuronal loss following early postnatal alcohol exposure. *Teratology* 1989;40(2):113-26.
87. Riikonen R, Salonen I, Partanen K, Verho S. Brain perfusion SPECT and MRI in foetal alcohol syndrome. *Dev Med Child Neurol* 1999;41(10):652-9.
88. Barnes DE, Walker DW. Prenatal ethanol exposure permanently reduces the number of pyramidal neurons in rat hippocampus. *Brain Res* 1981;227(3):333-40.
89. West JR, Chen W-JA, Pantazis NJ. Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab Brain Dis* 1994;9(4):291-322.
90. Mitchell JJ, Paiva M, Moore DB, Walker DW, Heaton MB. A comparative study of ethanol, hypoglycemia, hypoxia and neurotrophic factor interactions with fetal rat hippocampal neurons: a multi-factor in vitro model for developmental ethanol effects. *Dev Brain Res* 1998;105:241-50.
91. Ceccanti M, Mancinelli R, Tirassa P, Laviola G, Rossi S, Romeo M, Fiore M. Early exposure to ethanol or red wine and long-lasting effects in aged mice. A study on nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, hepatocyte growth factor, and vascular endothelial growth factor. *Neurobiol Aging* 2012;33(2):359-67.
92. Raivio N, Tiraboschi E, Saarikoski ST, Castrén E, Kiianmaa K. Brain-derived neurotrophic factor expression after acute administration of ethanol. *Eur J Pharmacol*. 2012;15:687(1-3):9-13.
93. Sun AY, Simonyi A, Sun Gy. The "French Paradox" and beyond: the neuroprotective affects of polyphenols. *Free Radic Biol Med* 2002;32(4):314-8.