

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA MOL·LECULAR

EFFECTOS MODULADORES DEL ETANOL SOBRE EL  
SISTEMA INMUNITARIO: PAPEL DE LOS RECEPTORES  
TLR4.

SARA FERNÁNDEZ LIZARBE

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2010

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 2 de març de 2010 davant un tribunal format per:

- Dr. Lisardo Boscá Gomar
- Dr. Jaime Renau Piqueras
- Dra. María Burgal Martí
- Dra. M<sup>a</sup> Isabel Colado Megía
- Dra. María Luisa Gil Herrero

Va ser dirigida per:

Dra. Consuelo Guerri Sirera

©Copyright: Servei de Publicacions  
Sara Fernández Lizarbe

---

Dipòsit legal: V-2072-2011

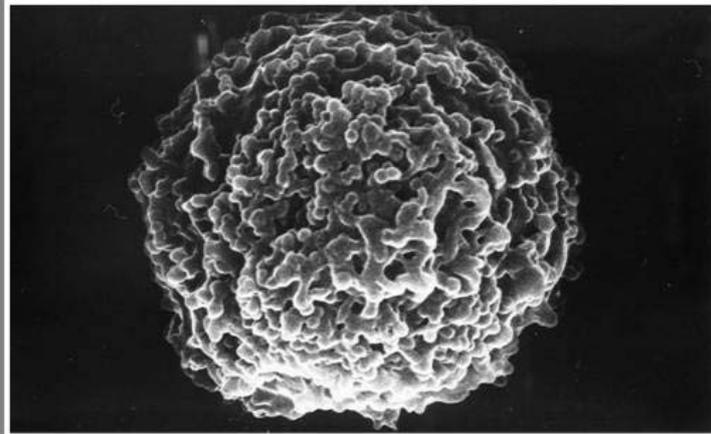
I.S.B.N.: 978-84-370-7803-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115

Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Universidad de Valencia



**EFFECTOS MODULADORES DEL ETANOL  
SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO: PAPEL  
DE LOS RECEPTORES TLR4**



TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:  
SARA FERNÁNDEZ LIZARBE

DIRIGIDA POR:  
CONSUELO GUERRI SIRERA



Valencia 2010

## AGRADECIMIENTOS

Para la realización de esta tesis ha contribuido mucha gente, espero no olvidarme de nadie.

Gracias a Chelo por haberme dado esta oportunidad, por tu cercanía, por haber confiado en mi y haberme dado la autonomía que muy pocos me hubiesen dado y a Enrique O'Connor, mi tutor, por estar siempre dispuesto a ayudar a tus necesitados alumnos. Por supuesto tengo que agradecer al resto de personas con las que he coincidido durante estos 4 años en el laboratorio de Chelo, a María, Marisa, Rosa, Maya, Raquel, Rebeca, Ana, Mariam, Silvia, Irene, a los técnicos que han cuidado tan bien de nuestros animales (Elena, M<sup>a</sup> Carmen y M<sup>a</sup> Jose) y por supuesto a Blanca.

También quiero agradecer al Centro de Investigación Príncipe Felipe por poner a mi disposición la infraestructura necesaria para la realización de este trabajo, así como a todos los servicios que he utilizado durante este periodo: al servicio de confocal por esforzarse en sacar siempre la mejor foto (Eva y Alberto), al servicio de citometría y al servicio de animalario.

Gracias a Blanca y a Edu por estar siempre dispuestos a escucharme, a ayudarme, por todos los buenos y malos momentos, sin vosotros me hubiera vuelta loca! También tengo que agradecer al resto de personas que han conseguido hacer el trabajo más agradable: a Macarena y Vanesa, a Virginia, a Eva y Alberto, a M<sup>a</sup> Jose y a todos los demás que han pasado por el centro amenizando las comidas.

Gracias a mi familia, a mis padres, a mis hermanos y cuñados, a mi abuela, a mis tíos y primos, y, a mis sobrinas Andrea y Alejandra. A mi madre, a Nieves y Javier por ayudarme con las figuras y las correcciones.

Aunque lo deje para el último lugar, la persona a la que más tengo que agradecer es a mi marido. Sin él, sin su apoyo, jamás habría acabado esta tesis. Muchas gracias Miguel.

**ÍNDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1. SISTEMA INMUNITARIO .....	9
1.1.1. <i>Inmunidad innata e inmunidad adquirida.....</i>	<i>9</i>
1.1.2. <i>Los macrófagos y su participación en la respuesta inmunitaria. 14</i>	<i>14</i>
1.1.3. <i>La microglía y su participación en la respuesta inmunitaria .....</i>	<i>16</i>
1.2. EL PAPEL DE LOS RECEPTORES TOLL EN LA RESPUESTA INMUNITARIA .....	19
1.2.1. <i>Sistema inmunitario y receptores tipo Toll.....</i>	<i>19</i>
1.2.2. <i>La familia de las MAPK.....</i>	<i>26</i>
1.2.3. <i>El lipopolisacárido bacteriano como ligando de TLR4.....</i>	<i>29</i>
1.2.4. <i>El papel de los lipid rafts en la activación y señalización de los receptores tipo Toll. ....</i>	<i>31</i>
1.3. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO.....	33
1.4. ALCOHOL Y NEURODEGENERACIÓN .....	37
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>41</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1. ANIMALES.....	47
3.2. CULTIVOS CELULARES.....	47
3.2.1. <i>Cultivo de células RAW 264.7.....</i>	<i>47</i>
3.2.2. <i>Aislamiento de macrófagos peritoneales.....</i>	<i>48</i>
3.2.3. <i>Cultivo primario de células microgliales.....</i>	<i>49</i>
3.2.4. <i>Cultivo primario de neuronas corticales.....</i>	<i>50</i>
3.2.5. <i>Obtención de suero de ratón.....</i>	<i>50</i>
3.3. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS Y ADMINISTRACIÓN DE ETANOL .....	51
3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO .....	52
3.5. MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN DE LA MICROGLÍA .....	52
3.6. ESTUDIO DE FAGOCITOSIS EN CÉLULAS MICROGLIALES .....	53
3.7. INMUNOTRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
3.7.1. <i>Obtención del lisado celular.....</i>	<i>53</i>

3.7.2. Obtención de extracto nuclear en células RAW 264.7 y en microglía .....	54
3.7.3. Inmunoprecipitación .....	54
3.7.4. Electroforesis e inmunotransferencia .....	55
3.7.5. Transferencia en gota .....	56
3.7.6. Electroforesis en condiciones nativas .....	56
3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS .....	59
3.8.1. Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 .....	59
3.8.2. Medida de la concentración de nitritos .....	59
3.8.3. Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ , NO e IL-10 en la cavidad peritoneal .....	60
3.9. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS DE NEURONAS CORTICALES DE RATA Y RATÓN .....	60
3.9.1 Análisis de apoptosis de neuronas .....	60
3.9.2 Determinación de la concentración de etanol en el medio de cultivo .....	61
3.10. AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA LIPID RAFTS .....	62
3.10.1 Aislamiento de lipid rafts de células RAW 264.7 .....	62
3.10.2 Separación de las fracciones solubles e insolubles en Triton X-100 .....	63
3.11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD .....	64
3.12. INMUNOFLOURESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL .....	65
3.12.1. Estudio de la expresión y localización del TLR4 y TLR2 .....	65
3.12.2. Estudio de la expresión y localización de las moléculas MHC-I y MHC-II en macrófagos .....	66
3.13. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA IN VIVO: INMUNOHISTOQUÍMICA .....	66
3.13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	68
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>69</b>
4.1. EL ETANOL MODULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LAS CÉLULAS RAW 264.7 .....	71
4.1.1. El tratamiento con etanol induce un cambio morfológico en las células RAW 264.7 .....	71
4.1.2. El etanol activa las rutas de señalización de las MAPK y NF- $\kappa$ B .....	72
4.1.3. El etanol induce la expresión de iNOS y COX-2 en las células RAW 264.7 .....	76

4.1.4. El etanol ocasiona un incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ .....	79
4.1.5. El LPS y el etanol activan a los receptores TLR4 e IL-1RI e inducen la translocación de TLR4, IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK a los lipid rafts .....	83
4.2. EL ETANOL GENERA UN PROCESO INFLAMATORIO EN CÉLULAS MICROGLIALES DE RATA .....	89
4.2.1. El etanol provoca cambios en la morfología de células microgliales.....	89
4.2.2. El etanol activa la vía asociada al TLR4 en la microglía: vía de las MAPK y de NF-KB .....	91
4.2.3. El etanol induce la producción de citocinas en células microgliales.....	97
4.3. LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA PROVOCA LA MUERTE DE LAS NEURONAS CORTICALES.....	99
4.4. EL ETANOL ACTIVA LA VÍA MYD88-INDEPENDIENTE ASOCIADA AL RECEPTOR TLR4 EN CÉLULAS MICROGLIALES.....	101
4.5. PAPEL DEL TLR4 EN LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA PRODUCIDA POR EL ETANOL .....	104
4.5.1. El etanol activa la vía MyD88-dependiente e independiente a través del TLR4.....	104
4.5.2. El receptor TLR4 está implicado en el daño neuronal producido por la microglía activada por etanol.....	107
4.5.3. El etanol no induce la formación de ligandos endógenos en la microglía.....	108
4.6. EFECTOS DEL TRATAMIENTO DEL ETANOL <i>IN VIVO</i> SOBRE LAS CÉLULAS MICROGLIALES .....	111
4.7. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA ACETILACIÓN DE HISTONAS: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4.....	113
4.8. MECANISMO DE LAS INTERACCIONES DEL ETANOL CON LOS TLR EN MICROGLÍA: PAPEL DE LOS <i>LIPID RAFTS</i> .....	116
4.8.1. Papel de los lipid rafts en la activación de la microglía por el etanol.....	116
4.8.2. Implicación del receptor TLR2 en la activación de la microglía por el etanol.....	118
4.8.3. La activación de los receptores TLR2 y TLR4 por sus ligandos promueve una translocación de los receptores a caveolas.....	119
4.8.4. El etanol modifica la localización en membrana de los receptores TLR2 y TLR4.....	121
4.9. EFECTOS DE DOSIS DE AGUDAS DE ETANOL SOBRE LA INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA EN MACRÓFAGOS PERITONEALES: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4 .....	125

4.9.1. <i>El etanol induce un incremento en la producción de TNF-<math>\alpha</math>, NO e IL-10 en la cavidad peritoneal a través del TLR4</i> .....	126
4.9.2. <i>Estudio de la expresión de moléculas MHC tras el tratamiento con etanol en macrófagos peritoneales</i> .....	128
4.9.3. <i>El etanol modula la asociación de las moléculas de clase I y II del MHC con los lipid rafts</i> .....	132
4.10. EFECTOS DEL CONSUMO CRÓNICO DE ETANOL SOBRE LAS MOLÉCULAS MHC-I Y MHC-II EN MACRÓFAGOS PERITONEALES: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4.....	138
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>143</b>
5.1. EL ETANOL MODULA LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LOS MACRÓFAGOS.....	145
5.1.1. <i>Acciones del etanol sobre la respuesta inmunitaria innata</i> .....	145
5.1.2. <i>Acciones del etanol sobre la respuesta adaptativa</i> .....	149
5.2. EL ETANOL ACTIVA A LA MICROGLIA Y CAUSA APOPTOSIS DE LAS NEURONAS.....	154
5.3. EL ETANOL ACTIVA A LA MICROGLÍA A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES TLR4.....	157
5.4. MECANISMO DE ACTUACIÓN DEL ETANOL.....	161
5.4.1. <i>Papel de los lipid rafts en la activación de la vía de señalización asociada al receptor TLR4 producida por el etanol</i> .....	161
5.4.2. <i>Papel del receptor TLR2 en la activación de las células microgliales por el etanol</i> .....	167
5.4.3. <i>Posible papel de los lipid rafts en las acciones del etanol sobre la inmunidad adquirida</i> .....	169
5.4.4. <i>El etanol induce cambios epigenéticos en células microgliales</i> .....	171
5.6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	173
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>175</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>179</b>

---

## ABREVIATURAS

**BrdU:** bromodeoxi-uridina  
**COX2:** ciclooxigenasa 2  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
**DMEM:** medio Eagle modificado por Dulbecco  
**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares  
**FITC:** isotiocianato de fluoresceína  
**GAPDH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa  
**IFN:** interferón  
**IκB:** inhibidor del factor κB  
**IKK:** quinasa de IκB  
**IL:** interleucina  
**IL-1R:** receptor de la IL-1  
**INF:** interferón  
**iNOS:** óxido nítrico sintasa inducible  
**IP-10:** proteína inducible por interferón gamma-10  
**IRAK:** quinasa asociada a IL-1R  
**IRF:** factor regulador de interferón  
**JNK:** quinasa del extremo N-terminal de c-Jun  
**LPS:** lipopolisacárido bacteriano  
**LRR:** repeticiones ricas en leucina  
**LTA:** ácido lipoteicoico  
**MAPK:** proteínas quinasas activadas por mitógenos  
**MCP-1:** proteína quimiotáctica de macrófagos-1  
**MHC:** moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad  
**MyD88:** factor de diferenciación mieloide 88  
**NFκB:** factor nuclear kappa B  
**NO:** óxido nítrico  
**PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida  
**PAMP:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PBS:** tampón fosfato salino  
**PE:** ficoeritrina  
**RNA:** ácido ribonucleico  
**SBF:** suero bobino fetal  
**SDS:** dodecilsulfato sódico  
**SLO:** estreptolisina-O  
**SNC:** sistema nervioso central  
**STAT:** transductor de señal y activador de la transcripción  
**SPF:** libre de patógenos  
**TAB:** proteína unida a TAK  
**TAK:** quinasa asociada a TGF- $\alpha$   
**TBS:** tampón tris salino  
**TIR:** dominio Toll/IL-1R  
**TIRAP:** proteína adaptadora que contiene el dominio TIR  
**TLR:** receptores tipo toll  
**TNF:** factor de necrosis tumoral  
**TRAF6:** factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6  
**TRAM:** molécula adaptadora relacionada con TRIF  
**TRIF:** proteína adaptadora asociada al dominio TIR que induce interferón- $\beta$   
**TRITC:** isocianato de tetrametil-rodamina  
**VCAM-1:** molécula de adherencia de células vasculares

## **1. INTRODUCCIÓN**



## **1.1. SISTEMA INMUNITARIO**

### **1.1.1. Inmunidad innata e inmunidad adquirida**

El sistema inmunitario está formado por un conjunto complejo de células, órganos especializados y mecanismos que protegen al organismo de infecciones mediante la identificación y eliminación de agentes patógenos. Según el tipo de respuesta que predomine frente a una infección, clásicamente la respuesta inmunitaria se puede clasificar como respuesta innata y respuesta adquirida. Las principales diferencias entre ambas son los mecanismos y los tipos de receptores usados para el reconocimiento antigénico (Tabla I).

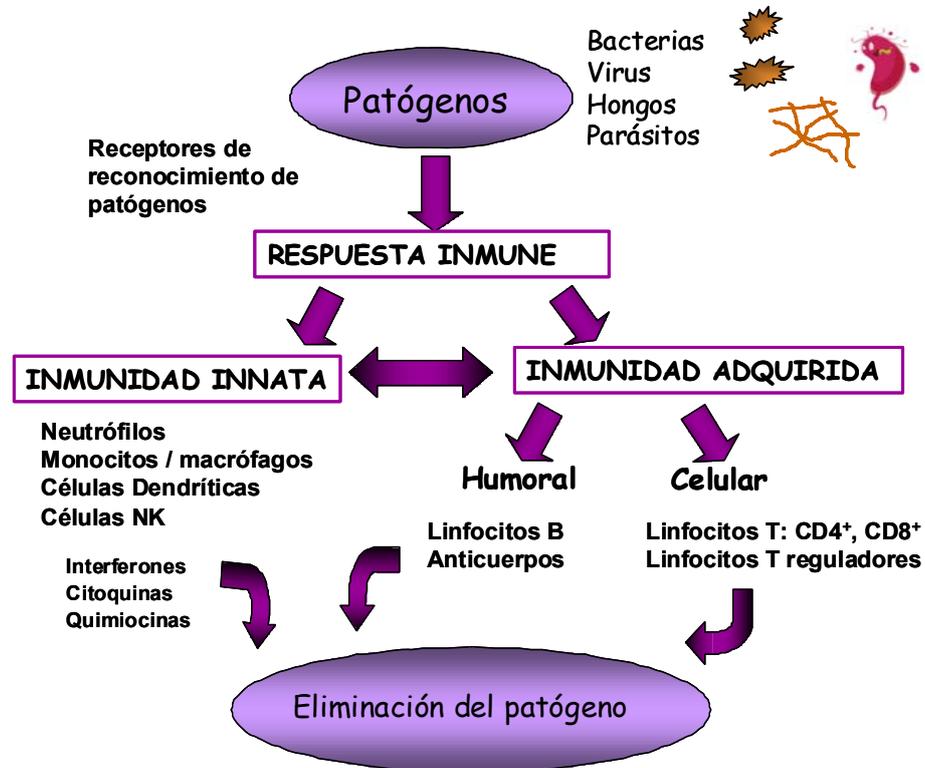
La inmunidad innata es la primera barrera defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa. En este tipo de inmunidad intervienen las barreras físicas y químicas (epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales), proteínas plasmáticas (sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación) y varios tipos celulares como las células NK (*Natural Killer*), neutrófilos, células dendríticas o macrófagos (Rollinghoff, 1997). Los fagocitos realizan una labor relevante, ya que son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y, además, liberan otras moléculas, como por ejemplo la enzima activadora de plasminógeno y la fosfolipasa, radicales de oxígeno, peróxido, el factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos (Trinchieri, 1997).

**Tabla I. Características principales de la inmunidad innata y adquirida**  
(Janeway and Medzhitov, 2002).

Propiedad	Sistema inmunitario innato	Sistema inmunitario adquirido
Receptores	Fijos en el genoma. No es necesario el reagrupamiento	Codificados en segmentos génicos. Necesario un reagrupamiento
Distribución	No clonal, todas las células de un determinado tipo son idénticas	Clonal, todas las células de un determinado tipo son distintas
Reconocimiento	Patrones moleculares conservados (LPS, LTA, glicanos)	Detalles/características de la estructura molecular (proteínas, péptidos, hidratos de carbono)
Discriminación entre lo propio y lo extraño	Seleccionada ancestralmente	Seleccionada a nivel celular
Tiempo de acción	Activación de efectores inmediata	Activación de efectores retardada
Respuesta	Moléculas co-estimuladoras	Expansión clonal
	Citocinas (IL-1 $\beta$ , IL-6)	IL-2
	Quimiocinas (IL-8)	Citocinas efectoras (IL-4, IFN $\gamma$ )

Las células del sistema inmunitario innato son capaces de reconocer estructuras altamente conservadas que están presentes en procariontes pero que las células eucarióticas carecen de ellas (Medzhitov

and Janeway, 2000b). Estas estructuras se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los receptores involucrados en su identificación son los denominados receptores que reconocen los PAMP (Medzhitov and Janeway, 2000a).



**Figura 1. Inducción de la respuesta inmunitaria por patógenos.** Los patógenos pueden ser reconocidos por receptores del sistema innato inmunitario e iniciar una respuesta. En la respuesta innata se produce el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos y monocitos, células dendríticas y células NK. Estas células también producen mediadores con el objetivo de inhibir al patógeno (interferones), reclutar otras células (quimiocinas) y regular otros agentes inmunes (citocinas). La inmunidad innata, a través de la presentación antigénica, es el inicio de la respuesta adquirida. Todos estos procesos trabajan coordinados y regulados para conseguir la eliminación del patógeno (Szabo and Mandrekar, 2009).

Las respuestas innata y adquirida funcionan de forma coordinada y comparten muchos elementos (Figura 1). La respuesta inmunitaria adquirida se desarrolla solo frente a la sustancia o el patógeno que indujo su iniciación y las características que la diferencian de la inmunidad innata son:

- *Especificidad*. La respuesta va dirigida específicamente a determinada molécula antigénica, determinante antigénico o epítipo, que es reconocida por los linfocitos a través de receptores de membrana capaces de identificar y distinguir diferencias entre diversos antígenos.

- *Memoria inmunológica*. Existe un incremento en la intensidad de la respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo antígeno.

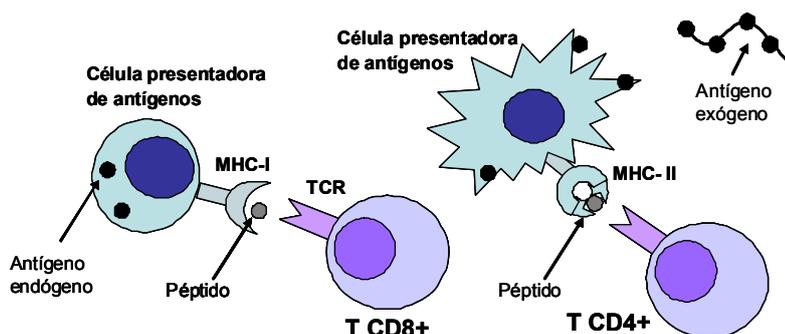
- *Heterogeneidad o diversidad*. Existe una gran diversidad en los linfocitos resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios de unión de los antígenos en los receptores linfocíticos.

- *Multifactorialidad*. La respuesta inmunitaria depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del individuo que responde. El tipo, la virulencia, la cantidad o la dosis del agente agresor y su vía de penetración pueden generar varios tipos de respuestas. Además, la edad y las características genéticas del individuo afectado pueden ser elementos determinantes (Abbas et al., 1995; Villafuerte, 1990).

En el sistema inmunitario adquirido se produce un reconocimiento específico del antígeno y para ello intervienen tres tipos de moléculas (Abbas et al., 1995):

- Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) que se presentan o bien como receptores de membrana en los linfocitos B, o bien son secretados por éstos.
- El receptor T (TCR) de los linfocitos T que reconoce péptidos unidos a receptores denominados moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

- Las moléculas de MHC que interactúan con el antígeno con baja especificidad. Existen dos tipos de receptores MHC, de clase I y de clase II en función del tipo de antígeno (Figura 2). Mientras que los primeros están presentes en todas las células nucleadas, los últimos están restringidos a un número limitado de células del sistema inmunitario.



**Figura 2. Presentación antigénica.** Las células presentadoras de antígenos presentan los antígenos endógenos, a través de las moléculas MHC de clase I, a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mientras que las de clase II presentan péptidos de antígenos extracelulares a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras su procesamiento.

Las células del sistema inmunitario innato inician muchas de las respuestas adquiridas. Las células dendríticas y los macrófagos internalizan y procesan los antígenos, exponiendo los productos obtenidos a través de las moléculas de MHC de clase II. Estas células presentan el complejo MHC-II-antígeno que es reconocido por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La interacción será crítica para determinar el tipo de respuesta. Si la célula presentadora de antígenos secreta IL-12 y el linfocito interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), se desencadena una respuesta inmunitaria mediada por células (respuesta tipo 1, citotóxica). Si se secreta al medio IL-4 e IL-10 la respuesta es mediada por los anticuerpos, produciéndose un aumento en la concentración de

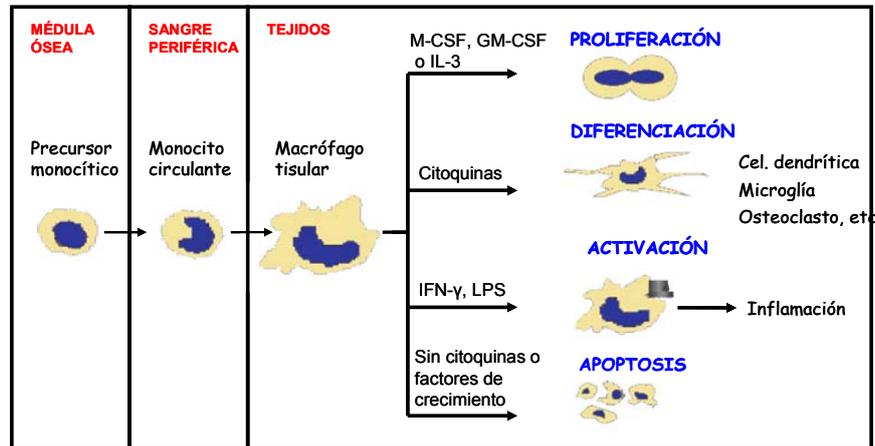
inmunoglobulinas (respuesta tipo 2, de proliferación y síntesis de anticuerpos) (Macatonia et al., 1995; Mosmann and Sad, 1996).

Tras el reconocimiento del antígeno, se produce la fase de activación de los linfocitos, caracterizada por la proliferación (expansión de los clones específicos frente al antígeno que inicia la respuesta) y la diferenciación (que posibilita que las células cuya función inicial era reconocer pasen a ser células efectoras con los mecanismos necesarios para eliminar los antígenos extraños). La respuesta inmunitaria finaliza con la fase efectora en la que los linfocitos que han sido activados eliminan el antígeno.

### **1.1.2. Los macrófagos y su participación en la respuesta inmunitaria**

Los macrófagos participan en la respuesta innata, reconociendo al patógeno o actuando como fagocitos, e intervienen en la conexión con el sistema adquirido actuando como células presentadoras de antígenos. Proceden de células pluripotenciales de la médula ósea de la serie granulocítico-monocítica. Estas células se van diferenciando en presencia de distintos factores de crecimiento y citocinas como GM-CSF (factor de crecimiento de colonias de granulocitos y macrófagos) o como la interleucina 3 (IL-3). Tras su proliferación y varios estadios de diferenciación, se originan los monocitos, que pueden pasar al torrente circulatorio y desde allí, a los tejidos gracias a una interacción con moléculas de adhesión. El monocito en los distintos tejidos, culmina su diferenciación y se convierte en macrófago. En esta transformación se produce, entre otros, un aumento de su tamaño, se desarrolla el sistema lisosomal y se incrementan el número de mitocondrias y su metabolismo energético (Valledor et al., 1998). El macrófago realiza diversas funciones dependiendo del tejido donde reside. Pueden diferenciarse a células de microglía en el sistema nervioso, a osteoclasto en hueso, a histiocitos en tejido conectivo, a células de Kupffer en el hígado, a células de clase A del

tejido sinovial, a células de Langerhans de la dermis o convertirse en células dendríticas (Valledor et al., 1998; Xaus et al., 2001). La mayor parte de los macrófagos que llegan a los tejidos desaparecen, muriendo por apoptosis, aunque pueden recibir señales que provocan su proliferación o activación (Figura 3).



**Figura 3. Maduración de macrófagos.** Los macrófagos originarios de médula ósea llegan a través del torrente circulatorio a los distintos tejidos. Allí en función del estímulo sufren diversos cambios. Pueden proliferar, diferenciarse, activarse o morir por apoptosis.

Los macrófagos participan en diversos mecanismos del sistema inmunitario. Dentro de la inmunidad innata, los macrófagos participan en la defensa frente a patógenos y coordinan la infiltración de leucocitos. Son capaces de fagocitar y así eliminar partículas extrañas. También pueden inducir la apoptosis de células tumorales mediante la secreción de enzimas (como por ejemplo, perforina y granzima), citocinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, o mediante interacción célula-célula. Además, pueden provocar la muerte de microorganismos a través de la actuación de enzimas (lisozima). Dentro de la inmunidad adquirida, actúan

como células presentadoras de antígenos, activando a los linfocitos T (Martinez et al., 2008; McCoy and O'Neill, 2008).

En función del estímulo que active a los macrófagos sus acciones difieren. En respuesta a IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  o a ligandos de los receptores tipo Toll, pueden secretar citocinas proinflamatorias y desarrollarse la presentación antigénica asociada a una respuesta tipo 1 para combatir a parásitos intracelulares. En respuesta a IL-4 e IL-13 se potencia la presentación antigénica, se secretan quimiocinas para reclutar a eosinófilos, basófilos y algunos linfocitos y aumenta la expresión de receptores del complemento. En respuesta a complejos inmunitarios o a algunos ligandos de receptores tipo Toll, se promueve la diferenciación de los linfocitos hacia una respuesta tipo 2 o pueden dar una respuesta anti-inflamatoria debido a la presencia de IL-10, glucocorticoides o el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (Martinez et al., 2008).

### **1.1.3. La microglía y su participación en la respuesta inmunitaria**

El sistema nervioso central está compuesto por dos tipos de células, las células nerviosas y las células gliales. Las células gliales las componen los astrocitos, los oligodendrocitos y las células de microglía; para estas últimas también se utilizará en término genérico de microglía. A principios del siglo XX, Pío del Río Hortega, un discípulo de Santiago Ramón y Cajal, describió la microglía por primera vez como un tipo celular del sistema nervioso central, con unas características morfológicas y unas tinciones que la distinguen de otras células gliales y de las neuronas (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999; Hanisch and Kettenmann, 2007; Kim and de Vellis, 2005).

La microglía tiene origen mesenquimal e invade el cerebro durante el desarrollo en dos etapas. La primera durante el desarrollo fetal (los dos primeros trimestres de embarazo en humanos y entre los días 10 y 19 de gestación en roedores) y una segunda etapa durante los primeros días

postnatales. Durante el desarrollo, las células de microglía se transforman desde la forma activa ameboide fagocítica a la ramificada quiescente propia del SNC maduro (Chan et al., 2007; Kim and de Vellis, 2005).

La microglía comparte funciones de la inmunidad innata con otros fagocitos mononucleados, como macrófagos, monocitos y células dendríticas. Participa en la limpieza de restos celulares, generación de señales para la restauración de tejidos y resistencia a patógenos. Además colabora en el inicio de la respuesta adaptativa actuando como célula presentadora de antígenos y mandando señales a los linfocitos T para regular la respuesta efectora. La microglía también es capaz de responder a las señales que los linfocitos T activados secretan, como IFN- $\gamma$ , TNF e IL-1 (Harry and Kraft, 2008; Ransohoff and Perry, 2009). Al activarse se produce un cambio fenotípico y morfológico. Puede activarse por distintos estímulos: factores que, en condiciones normales, no suelen estar presentes (estructuras microbianas), factores que han alcanzado una concentración crítica (constituyentes intracelulares), que están presentes en una estructura diferente (agregados proteicos) o por la unión ligando-receptor. La activación de las vías de señalización de las células microgliales no sólo ocurre en respuesta a organismos infecciosos, sino también se produce en un daño cerebral o durante una infección. La microglía sufre una transformación desde su estado ramificado quiescente a presentar una morfología ameboide y un incremento en la expresión de varias moléculas de superficie (CD14, MHC o receptores de quimiocinas) (Block et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007; Rivest, 2009).

En el estado activado, la microglía ejerce una función esencial para la supervivencia neuronal y la inmunidad innata. Elimina restos celulares tóxicos, aumenta la supervivencia neuronal produciendo factores tróficos y anti-inflamatorios. Además, en el cerebro maduro, facilita la reparación guiando la migración de células madre hasta el sitio de inflamación o daño, pudiendo estar implicada en la neurogénesis (Block et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007).

Ciertos estímulos provocan que la microglía alcance un estado de sobre-activación. En él predominan los efectos neurotóxicos, secretando una serie de factores citotóxicos como óxido nítrico (NO) y TNF $\alpha$ . Aunque la activación de la microglía puede ser, en ciertos casos beneficiosa, ya que puede reparar el daño o eliminar patógenos, su activación de forma crónica es un componente importante en las enfermedades neurodegenerativas y contribuye a la disfunción neuronal y al daño asociado con estas patologías (Kim and de Vellis, 2005; Streit et al., 2004). La enfermedad de Alzheimer se manifiesta con un deterioro cognitivo por la pérdida de memoria a corto plazo y trastornos conductuales como depresión. Se caracteriza por la presencia de placas seniles formadas por la proteína  $\beta$ -amiloide (placas amiloides) y por la formación de ovillos neurofibrilares, que son debidos a hiperfosforilación de las proteínas TAU originando su agregación anormal y ocasionando una destrucción de microtúbulos y neurofilamentos (Ballatore et al., 2007). La presencia de microglía activada rodeando las placas seniles en cerebros de enfermos de Alzheimer sugiere que estas células participan en la progresión de esta enfermedad. Incluso se ha detectado microglía activada en pacientes con deterioro cognitivo leve (MCI) que precede la progresión de esta enfermedad (Fiala and Veerhuis, 2009). Se ha propuesto que la proteína  $\beta$ -amiloide es capaz de activar a la microglía y generar la secreción de agentes citotóxicos, que conducen a una incapacidad de la microglía para fagocitar eficientemente (Block et al., 2007; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). La microglía también participa en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Esta patología se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas que conlleva una disfunción motora (Block and Hong, 2007). Estudios *in vitro* revelan que distintas sustancias liberadas por las neuronas dañadas ( $\alpha$ -sinucleína, metaloproteínasa MMP3 que degrada la matriz extracelular o la neuromelanina) activan a la microglía produciendo factores inflamatorios o especies reactivas de oxígeno que dañan las neuronas (Kim et al., 2007b; Wilms et al., 2003; Zhang et al., 2005). La activación de la microglía también está implicada en la progresión de la

demencia asociada al HIV. Esta demencia que aparece en las últimas etapas del SIDA, se caracteriza por una pérdida neuronal, astrogliosis reactiva, infiltración leucocitaria y la activación de las células microgliales (Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). Igualmente, la activación de la microglía se ha relacionado con otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, las enfermedades por priones o la enfermedad de Huntington (Block et al., 2007).

## **1.2. EL PAPEL DE LOS RECEPTORES TOLL EN LA RESPUESTA INMUNITARIA**

### **1.2.1. Sistema inmunitario y receptores tipo Toll**

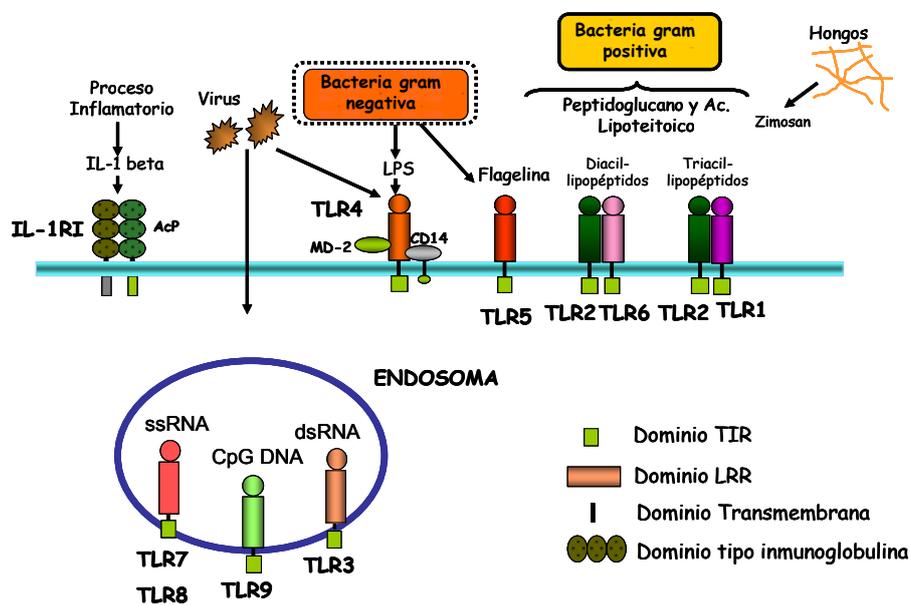
Los receptores tipo Toll (TLR) se describieron inicialmente en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* como moduladores de la polarización dorsoventral durante el desarrollo embrionario. Posteriormente se estableció que eran parte fundamental de la inmunidad innata de la mosca para su defensa frente a infecciones bacterianas y micóticas. En 1996, Taguchi describió el primer TLR en humanos, al que denominó TIL y que corresponde al TLR1 (Taguchi et al., 1996). Medzhitov identificó en 1997 una segunda molécula que denominó hToll, actualmente TLR4, y demostró que activaba el factor nuclear kappa beta (NFκB) y la síntesis de citocinas pro-inflamatorias (Medzhitov et al., 1997). Actualmente se conoce que la familia de los homólogos de Toll desempeña un papel crucial en la inmunidad innata. Los receptores tipo Toll son capaces de identificar a una gran variedad de antígenos ya que reconocen estructuras altamente conservadas que son expresadas por un gran número de microorganismos. Estos dominios estructurales, altamente conservados son los denominados PAMP.

Hasta el momento se han identificado 11 receptores TLR en humanos, mientras que en ratón se han identificado 13 TLR. Los TLR 1-9 están conservados entre el hombre y el ratón (Takeda and Akira, 2005). Los

receptores TLR son proteínas transmembrana tipo I que pertenecen a una gran superfamilia en la que se incluyen los receptores de IL-1, los IL-1R. Los TLR y los IL-1R poseen un dominio citoplasmático conservado que se denomina TIR (Toll/IL-1R) que está compuesto por unos 200 aminoácidos con regiones de homología que comprenden tres regiones conservadas que son cruciales para la señalización. Por otra parte, la estructura del dominio extracelular de los miembros de estas dos familias de receptores es distinta. La familia IL-1R tiene un dominio de tipo inmunoglobulina, mientras que los miembros de la familia TLR presentan un dominio con repeticiones ricas en leucinas (LRR: *Leucine-rich repeats*) formando una estructura cóncava implicada en el reconocimiento de patógenos (Akira and Takeda, 2004b; Loiarro et al., 2005).

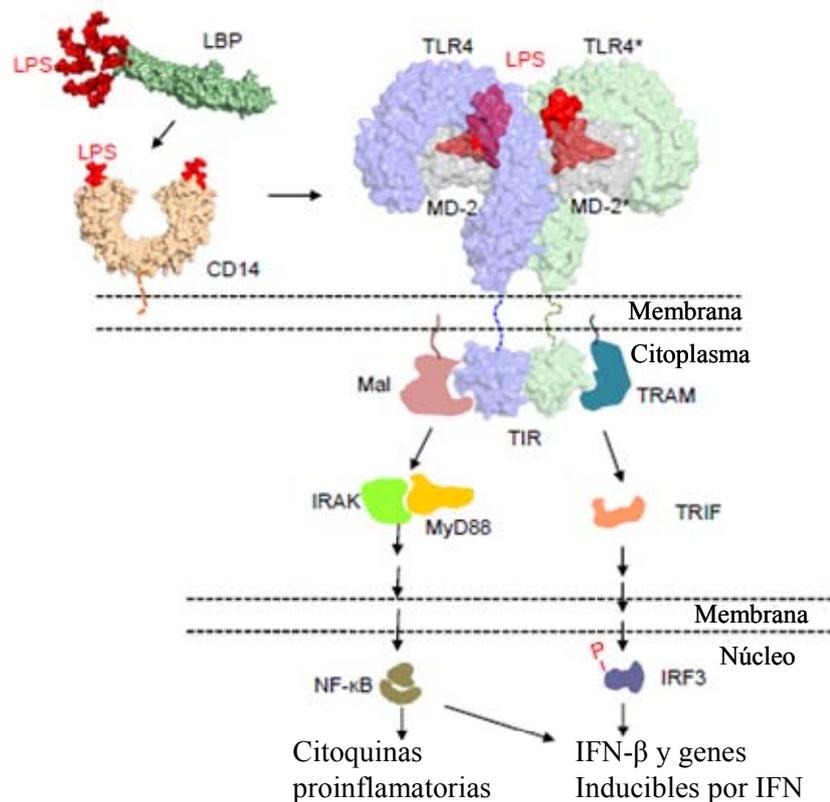
Los receptores TLR están implicados en el reconocimiento específico de componentes de microorganismos derivados de patógenos como bacterias, hongos, protozoos y virus. Los ligandos más importantes de estos receptores y su localización subcelular se recogen en la Figura 4 (Akira and Takeda, 2004a; Takeda and Akira, 2005). Referente a la localización celular de los receptores TLR, los receptores TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se localizan en membrana plasmática. El TLR2 forma heterodímeros con el TLR1 o con el TLR6 lo que les permite reconocer una alta variedad de componentes microbianos como péptidoglicanos, ácido lipoteicoico de bacterias Gram positivas o zimosan de hongos. El TLR2 además reconoce otras estructuras microbianas cooperando con diversas proteínas que pueden estar o no relacionadas estructuralmente con este receptor. El TLR3 está localizado en endosomas y responde a RNA de doble cadena (dsRNA). La replicación de algunos virus en células infectadas produce la generación de dsRNA que estimula células del sistema inmunitario. El TLR4, que se localiza en membrana plasmática, es esencial para la respuesta frente al lipopolisacárido bacteriano (LPS). Este receptor también se ha implicado en el reconocimiento de otros ligandos

como el taxol o ligandos endógenos como las proteínas de choque térmico HSP60 y HSP70. El TLR5 responde a flagelina, constituyente de los flagelos bacterianos, mientras que el TLR7 y TLR8, altamente conservados y localizados en endosomas, se ha observado que responden a productos sintéticos. Estos últimos receptores participan, además, en el reconocimiento de virus a través de RNA de cadena simple. El TLR9 se localiza en endosomas y es esencial en la respuesta al DNA bacteriano, reconoce motivos CpG sin metilar que es característico del DNA bacteriano (Akira and Sato, 2003; Takeda and Akira, 2005).



**Figura 4. La familia de receptores tipo Toll y sus principales ligandos.** Los TLR reconocen componentes microbianos tanto de virus, bacterias y de hongos. Se localizan en la membrana plasmática y en endosomas.

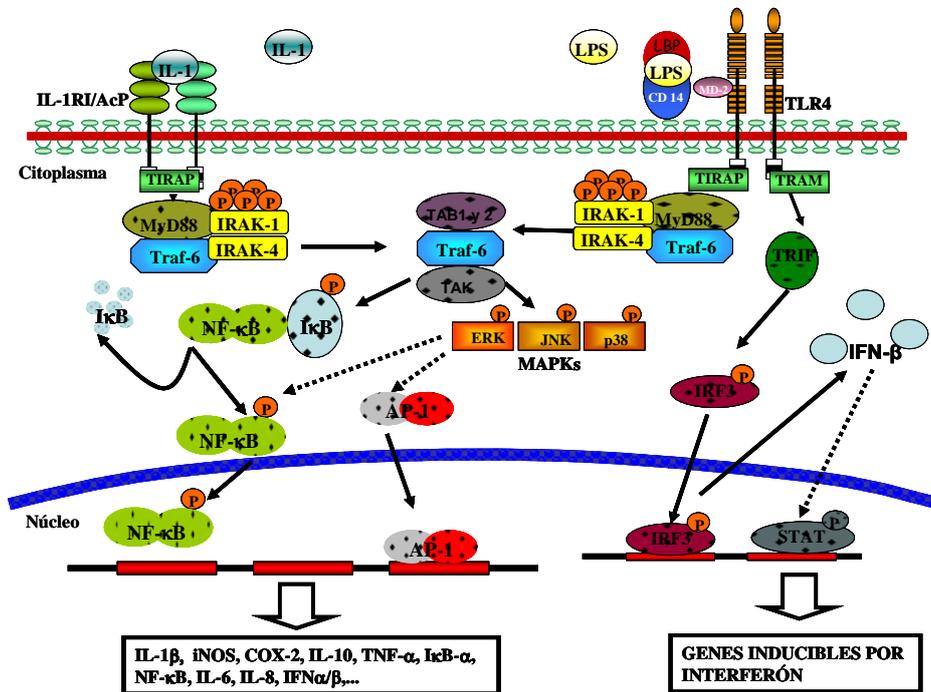
De todos los TLR, el primero identificado en humanos y mejor caracterizado es el TLR4. El ligando específico para este receptor es el lipopolisacárido o LPS, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. El TLR4 no reconoce directamente al LPS, sino que debe unirse a la proteína adaptadora MD-2 en su parte extracelular. El LPS a su vez, se une a la proteína de unión a LPS (LBP) y a la proteína CD14 localizada en la superficie de los fagocitos (Figura 5).



**Figura 5. Vía de señalización del LPS.** El LPS se une al TLR4 a través de las proteínas adaptadoras MD-2 y CD14 e inicia la cascada de señalización que culmina con la activación de factores nucleares (Park et al., 2009).

La interacción ligando-receptor provoca una dimerización del mismo y el inicio de la cascada de señalización en el que intervienen varias proteínas adaptadoras (Figura 6). La vía de señalización consiste, al menos, en dos rutas: vía MyD88-dependiente, común a todos los receptores TLR excepto al TLR3 y la vía MyD88-independiente, propia de TLR3 y de TLR4 (Kawai and Akira, 2007).

Tras unión del ligando, el receptor dimeriza y se inicia la vía MyD88 dependiente. El receptor cambia su conformación y facilita la unión de proteínas adaptadoras a través dominio TIR: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (TIRAP), también llamada Mal. La proteína MyD88 recluta y activa a IRAK-4 (quinasa asociada a IL-1R) que hiperfosforila a IRAK-1, necesario para formar un complejo con TRAF6 (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral 6). La formación del complejo IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 induce un cambio conformacional que libera el complejo del receptor. A continuación este complejo interacciona en la membrana con la proteína unida a TAK (TAB2) lo que provoca la liberación de las proteínas IRAK y la formación de un nuevo complejo compuesto por TAB2, TAK1 (quinasa asociada a TGF- $\alpha$ ), TAB1 y TRAF6 que se libera al citosol. La translocación al citosol hace que TAK1 se active y provoque la activación de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y de la quinasa de I $\kappa$ B (IKK) que fosforila a I $\kappa$ B (inhibidor de NF $\kappa$ B), degradándose ésta y liberando a NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B pasa al núcleo e induce la expresión de mediadores inflamatorios tales como la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la ciclooxigenasa-2 (COX2) y citocinas inflamatorias (Akira and Sato, 2003; Akira and Takeda, 2004a; McCoy and O'Neill, 2008).



**Figura 6.** Vía de señalización de los receptores IL-1RI/TLR4. El LPS y la IL-1 $\beta$  producen una cascada de señalización en la que están implicadas varias proteínas y que finaliza con la expresión de mediadores inflamatorios (vía MyD88 dependiente) y de genes inducibles por interferón (vía MyD88 independiente).

En la vía MyD88 independiente, la estimulación con LPS provoca la interacción del receptor con dos proteínas adaptadoras, la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) y la que induce interferón- $\beta$  y que contiene el dominio TIR (TRIF), produciéndose la activación del factor de transcripción IRF-3 (factor regulador de interferón) que se fosforila y se

transloca al núcleo donde induce la producción de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ). IFN- $\beta$  activa a las proteínas STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) con la consiguiente activación de genes inducibles por interferón como IFN- $\beta$ , IRF-1, IP-10 o VCAM-1. Esta vía se descubrió observando que el LPS era capaz de provocar una respuesta, aunque más lenta en ratones deficientes en MyD88 cuando se comparaba con la respuesta en ratones normales (Akira and Takeda, 2004b; Kawai et al., 2001; Toshchakov et al., 2002).

Todos los receptores TLR se expresan en el SNC, principalmente en células gliales. Los astrocitos en cultivo expresan todos los miembros de los TLR, exceptuando el TLR7 (Jack et al., 2005). La microglía expresa varios, los TLR 1-9, mientras que los oligodendrocitos expresan predominantemente el TLR2 y TLR3 (Okun et al., 2009). La estimulación de los TLR en las células gliales activa funciones que son importantes para la eliminación de patógenos, pero que también pueden ser tóxicas para otras células que tienen limitada su capacidad regenerativa (Carpentier et al., 2008; Rivest, 2009). En concreto, se ha descrito que la activación del TLR4 por su ligando LPS, produce neurodegeneración tanto *in vivo* como *in vitro*. El LPS, a través del receptor TLR4, activa a la microglía causando la muerte de oligodendrocitos, desmielinización e incrementando la vulnerabilidad de las neuronas (Block et al., 2007; Lehnardt et al., 2002; Lehnardt et al., 2003). La señalización de los TLR participa en la muerte o supervivencia celular tras un proceso inflamatorio. Se ha propuesto que la activación del TLR4 incrementa la apoptosis de células microgliales a través de la producción de IFN- $\beta$  (Jung et al., 2005).

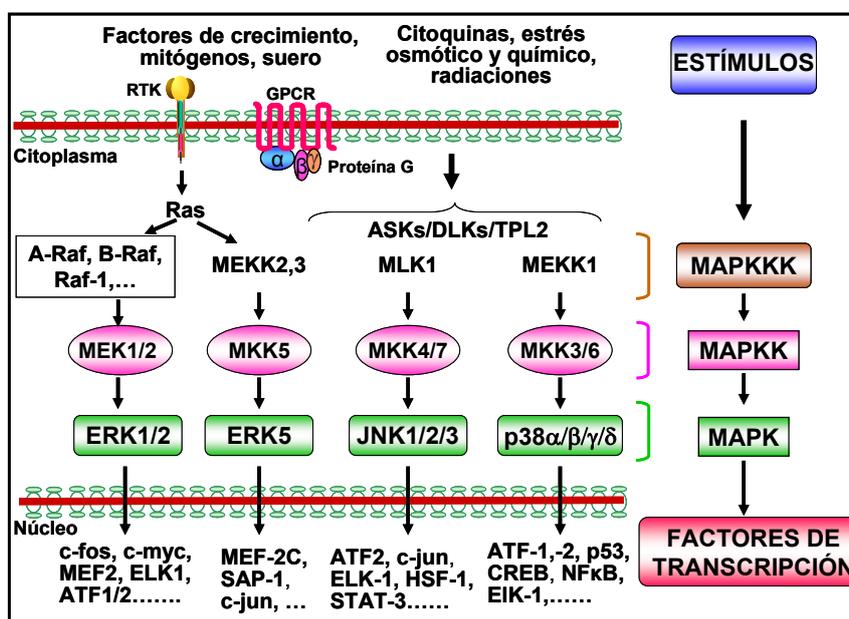
Otros miembros de la familia de los receptores de tipo Toll han sido menos estudiados. La mayor parte de los trabajos se centran en el TLR4 y en menor medida en el TLR2 debido a su importancia tras un daño producido en el SNC. Se ha observado un incremento en la transcripción del gen que codifica para TLR2 en microglía durante una infección, daño

cerebral o diversas enfermedades (Glezer et al., 2007). La inducción del mensajero del TLR2 se ha utilizado como marcador de microglía activada, pero su significado fisiológico aún no se conoce en profundidad (Laflamme et al., 2001). Los estudios con ratones deficientes en TLR2, han puesto de manifiesto que este receptor interviene en el daño cerebral causado por isquemia y es fundamental en la respuesta temprana de la microglía al daño cerebral (Babcock et al., 2006; Lehnardt et al., 2007). Adicionalmente, se ha observado que ratones deficientes en TLR4 y en TLR2 presentan reducida la zona infartada tras un daño producido por una isquemia local en el cerebro (Cao et al., 2007; Ziegler et al., 2007) y que estos dos receptores participan en el reclutamiento leucocitario que se produce tras un daño en el SNC (Babcock et al., 2008). La función que el TLR2 ejerce en oligodendrocitos no está totalmente esclarecida, pero existen evidencias que sugieren que participa en la reparación del SNC. Algunos autores proponen que la activación del TLR2 en oligodendrocitos podría tener un papel neuroprotector aumentando la mielinización de neuronas aunque estos resultados son controvertidos (Kigerl et al., 2007; Setzu et al., 2006). En resumen, tanto el TLR4 como el TLR2 actúan tras un daño cerebral y participan en procesos de apoptosis y supervivencia en el SNC.

### **1.2.2. La familia de las MAPK**

La activación de las MAPK se incluye en la vía de señalización de los receptores TLR. La familia de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK; *Mitogen-Activated Protein Kinases*) engloba mediadores de señalización intracelular implicados en la transducción de diversos estímulos extracelulares, desde la membrana al núcleo celular. Estas proteínas están implicadas en el control de diversas funciones celulares entre las que destacan la proliferación celular, diferenciación y apoptosis, modulando la expresión génica. La familia de las MAPK se subdivide en tres

subfamilias: ERK1/2, p38 MAPK y SAPK/JNK (Sumbayev and Yasinska, 2006) (Figura 7).



**Figura 7. La familia de las MAPK.** En la figura se representa un esquema de los tres módulos que constituyen la familia de las MAPK: ERK1/2, p38 MAPK y SAPK/JNK, así como los mecanismos de señalización implicados en la transducción de diversos estímulos extracelulares desde la membrana al núcleo celular (adaptado de Rubinfeld and Seger, 2005).

Una amplia variedad de estímulos extracelulares, tales como factores de crecimiento y estrés ambiental, inducen la activación de MAPK cuyos miembros son regulados por una cascada de doble fosforilación, secuencial y reversible, en treonina (T) y tirosina (Y) del motivo conservado TxY (donde x es un aminoácido que varía en función del módulo de MAPK). Su activación está mediada por dos proteínas quinasas que se activan en serie: una MAPKKK que fosforila a MAPKK que, a su vez, fosforila a la MAPK en cuestión. Una vez fosforiladas, y por lo tanto activadas, actúan sobre

diferentes sustratos entre los que se incluyen: proteínas quinasas, proteínas fosfatasas, proteínas mitocondriales, proteínas que forman parte estructural del citoesqueleto, fosfolipasas y factores de transcripción, los cuales van a ser fosforilados en Ser/Thr-Pro (Tanoue and Nishida, 2003). Los miembros de la familia de las MAPK no sólo se limitan a fosforilar determinados factores transcripcionales sino que se han propuesto, en algunos casos, como componentes integrales de los propios complejos de transcripción, por lo que las vías de señalización intracelulares pertenecientes a esta familia participarían directamente en la regulación de la transcripción génica. Además, también se ha descrito su implicación en la regulación de algunas modificaciones post-traduccionales como la acetilación o la ubiquitinización (Whitmarsh, 2007).

La activación de ERK1/2, llevada a cabo principalmente por estímulos mitogénicos, contribuye a la regulación del ciclo celular, proliferación y supervivencia mientras que p38 MAPK y SAPK/JNK, conocidas como proteínas de estrés, están implicadas en la promoción de la apoptosis y son activadas, esencialmente, por estímulos estresantes o citocinas proinflamatorias (Sumbayev and Yasinska, 2006; Torii et al., 2006). ERK1 y ERK2 son activadas por factores de crecimiento, suero y ésteres de forbol y, en menor medida, por citocinas y estrés osmótico. Una vez activadas, actúan sobre numerosos sustratos como proteínas de membrana, del citoesqueleto y factores de transcripción (Rubinfeld and Seger, 2005).

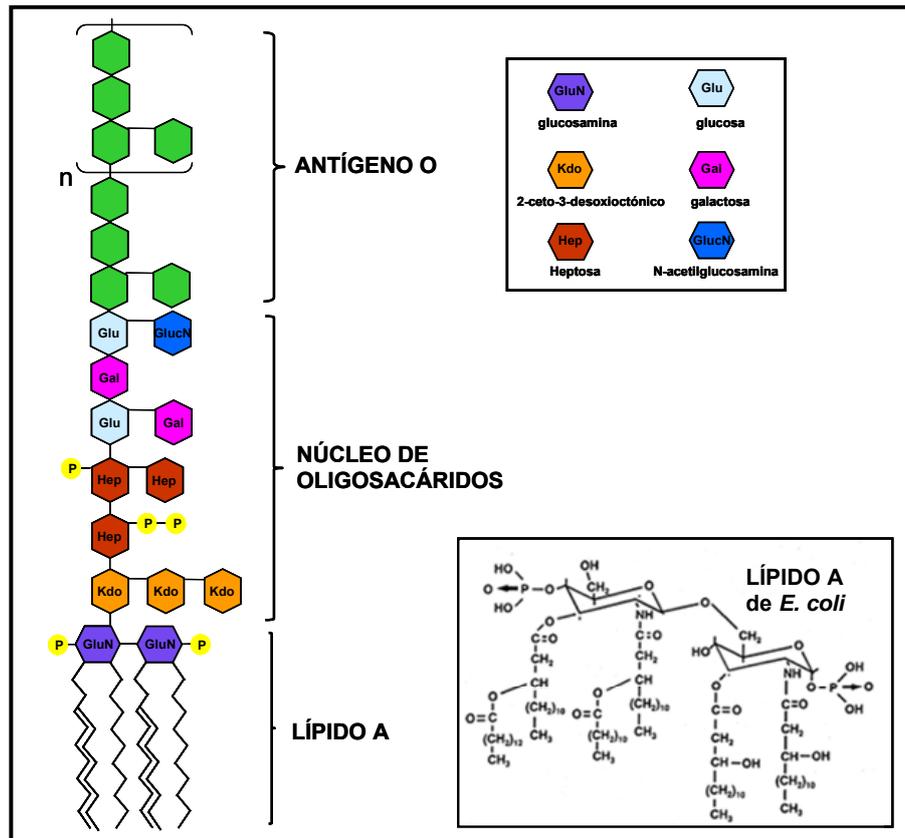
La MAPK p38 es activada por estrés ambiental y citocinas inflamatorias y mínimamente por estímulos mitogénicos. La mayoría de los estímulos que activan p38 también activan JNK. Algunos de los estímulos que las activan son: estreses físicos y químicos, tales como estrés oxidativo, radiación UV, hipoxia, isquemia y una variedad de citocinas, incluyendo IL-1 y TNF- $\alpha$ . (Roux and Blenis, 2004). La actividad de p38 es crítica para la respuesta inmunitaria e inflamatoria; esta MAPK se activa en macrófagos, neutrófilos y linfocitos T por numerosos mediadores extracelulares de la inflamación como quimioatrayentes, citocinas, quimiocinas y LPS. p38

participa en la quimiotaxis, exocitosis granular, adherencia y apoptosis de macrófagos y neutrófilos, así como en la diferenciación de células T y apoptosis mediante regulación de la producción de IFN- $\gamma$  (Dodeller and Schulze-Koops, 2006).

En mamíferos existen tres genes que codifican para JNK (JNK1, JNK2 y JNK3), también conocidas como SAPK $\gamma$ , SAPK $\alpha$  y SAPK $\beta$  respectivamente, y que originan al menos 10 isoformas diferentes de esta quinasa mediante una eliminación alternativa de intrones. La expresión tisular de JNK1 y JNK2 es ubicua mientras que la de JNK3 se encuentra restringida al cerebro. Son activadas en respuesta a citocinas, radiación UV y gamma, privación de factores de crecimiento, agentes que dañan al DNA y, en menor medida, por agonistas de los receptores acoplados a proteínas G, suero y factores de crecimiento (Nishina et al., 2004).

### **1.2.3. El lipopolisacárido bacteriano como ligando de TLR4**

Una amplia variedad de estructuras bacterianas son capaces de estimular el sistema inmunitario innato; éstas incluyen entre otras a lipopolisacáridos, peptidoglicanos, lipoarabinomananos, lipopéptidos, ácido lipoteicoico, DNA bacteriano y flagelina. El LPS, como se ha comentado anteriormente, es capaz de activar el sistema inmunitario a través del receptor TLR4. El LPS, también conocido como endotoxina bacteriana, es un glicolípido complejo, de naturaleza antipática, que se considera el principal componente de la cara externa de la membrana de las bacterias Gram-negativas y uno de los más potentes estimuladores microbianos de la respuesta inmunitaria innata. Su composición es variable en función de la especie bacteriana; así, el LPS procedente de *Escherichia coli*, que se ha utilizado en este trabajo, se estructura en tres regiones unidas covalentemente (Figura 8): un dominio hidrofóbico denominado lípido A, un núcleo central de oligosacáridos y un polisacárido distal que recibe el nombre de antígeno O (Dixon and Darveau, 2005).



**Figura 8. Estructura del LPS de *Escherichia coli*.** La estructura del LPS se puede dividir en tres regiones: el lípido A, el núcleo de oligosacáridos y el antígeno O. (Adaptado de Dixon and Darveau, 2005).

El lípido A, considerado el anclaje hidrofóbico del LPS, es prácticamente idéntico en todas las bacterias Gram-negativas; se compone de un disacárido formado por dos unidades de glucosamina, en el que casi todos los grupos hidroxilo y amino están sustituidos. Cinco, y a veces seis, cadenas de ácidos grasos saturados se unen a estos residuos de glucosamina, por enlaces éster. El lípido A es el componente bioactivo responsable de la toxicidad del LPS. El núcleo de oligosacáridos se puede dividir en dos fracciones, la del núcleo interno, rica en cargas negativas y formada por dos tipos de azúcares exclusivos de las bacterias Gram-

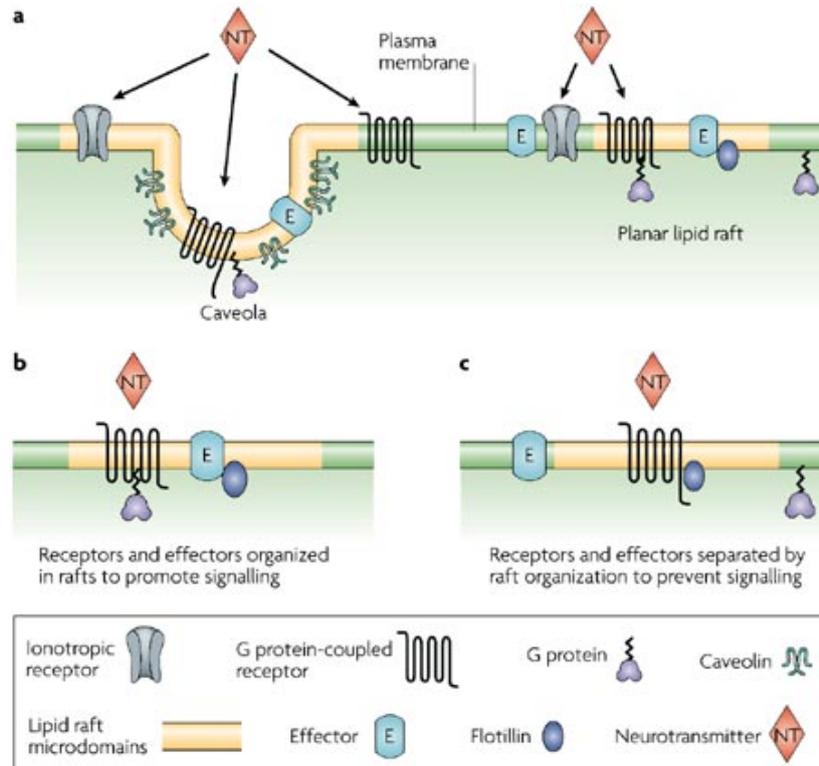
negativas, 2-ceto-3-desoxioctónico y L-glicero-D-manoheptosa, y la fracción del núcleo externo constituida por hexosas. La última región es el antígeno O, altamente variable entre especies y responsable de la especificidad antigénica del LPS. Está formado por la repetición de unidades tri-, tetra- o pentasacáridicas que constan, generalmente, de glucosa, galactosa, ramnosa y manosa, todos ellos azúcares de seis carbonos así como uno o más dideoxiazúcares poco frecuentes como abecucosa, colitosa, paratosa o tivelosa.

#### **1.2.4. El papel de los *lipid rafts* en la activación y señalización de los receptores tipo Toll.**

Los *lipid rafts* son microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos. Este concepto se ha traducido al castellano como balsas lipídicas, aunque el empleo de su término en inglés está más extendido. Se caracterizan por su insolubilidad en ciertos detergentes, como Triton X-100 al 1% a 4°C. Existen evidencias de que los *lipid rafts* juegan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata. Una de sus funciones es el reclutamiento y concentración de moléculas implicadas en la señalización celular. Los *lipid rafts* pueden ser considerados como plataformas de señalización que funcionan ensamblando y acercando los componentes requeridos, facilitando su interacción y señalización (Pike, 2003; Triantafilou and Triantafilou, 2005). Existen diferentes proteínas de andamiaje, como por ejemplo la actina, la flotilina-1 y la caveolina-1, que estabilizan estructuralmente estos microdominios (Pike, 2003) (Figura 9).

Algunos trabajos han demostrado que la estimulación del receptor TLR4 con LPS induce un reclutamiento en los *lipid rafts* de diversas proteínas que participan en la vía de señalización del receptor TLR4, así como de proteínas adaptadoras como el CD14 (Olsson and Sundler, 2006) o del propio receptor. También se ha observado un desplazamiento hacia

estos microdominios de otros receptores tipo Toll como el TLR2 (Triantafilou et al., 2002; Triantafilou et al., 2004).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 9. Los *lipid rafts* como plataforma de señalización.** A) Existen dos tipos de *lipid rafts*, unos recubiertos de caveolina que forman invaginaciones en la membrana y otros planos donde predomina como proteína de andamiaje la flotilina. Los *lipid rafts* median en la respuesta de algunos receptores de membrana, aproximando las moléculas necesarias para la señalización (B) o evitando que estén próximas físicamente (C) (Allen et al., 2007).

### 1.3. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Diferentes evidencias clínicas y experimentales sugieren que el etanol afecta al sistema inmunitario y a su respuesta, lo que causa una variación en los niveles de mediadores inflamatorios. El consumo tanto crónico como agudo se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer infecciones por bacterias y virus. Así, el consumo de etanol aumenta el riesgo a padecer neumonía (Boe et al., 2003; Quinton et al., 2005), contraer infecciones sistémicas e incluso retrovirales (Szabo, 1999; Szabo and Mandrekar, 2009).

El mecanismo por el que el abuso de etanol es capaz de deprimir el sistema inmunitario y aumentar el riesgo a padecer infecciones no se conoce en profundidad. Algunos autores proponen que puede bloquear la activación celular del endotelio durante la infección produciéndose un descenso en las interacciones de las células del endotelio con los leucocitos y, por lo tanto, un menor reclutamiento de las células efectoras al lugar de la infección (Saeed et al., 2004). Otros autores proponen que el etanol bloquea la capacidad de responder a las infecciones de distintas células del sistema inmunitario, como monocitos y macrófagos (Mandrekar et al., 2002), células dendríticas (Lau et al., 2006), linfocitos T (Szabo et al., 2004) y neutrófilos (Bautista and Wang, 2001).

Sin embargo, los efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario son complejos y dependen de la dosis, del tiempo de exposición (agudo o crónico), del tipo celular y de la presencia o ausencia de otros estímulos adicionales como, por ejemplo, el LPS. Así algunos trabajos demuestran que el tratamiento agudo de alcohol altera la respuesta inflamatoria mediada por los TLR en macrófagos, inhibiendo la respuesta a componentes microbianos. En monocitos humanos, el tratamiento moderado con etanol es capaz de impedir la translocación al núcleo de p65, subunidad de NFκB, que produce este ligando del TLR4 e interferir en la producción de citocinas proinflamatorias tales como el TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Mandrekar et al., 1997; Mandrekar et al., 1999; Mandrekar et al., 2002). El tratamiento con etanol *in*

vivo en ratones, también causa un descenso de citocinas producidas por el LPS, medidas en suero y en lavado peritoneal y de citocinas secretadas por macrófagos peritoneales (Pruett et al., 2005; Pruett et al., 2004c). En estas células se ha observado una supresión de la activación del TLR3 producida por etanol, disminuyendo la fosforilación de p38, evitándose la degradación de IRAK-1 y la translocación de NFκB al núcleo (Pruett et al., 2004a). El etanol también inhibe la secreción de citocinas producida por la activación de otros TLR tales como TLR2 y TLR9 (Goral and Kovacs, 2005). Además, el efecto del etanol parece depender del estímulo que inicie la cascada. Tiene un efecto supresor en monocitos humanos tratados con LPS, disminuyendo la producción de citocinas y fosforilación de IRAK-1 y MAPK e interfiriendo en la asociación de IRAK-1 con TRAF6. Sin embargo, si los monocitos se tratan con LPS y con un agonista de TLR2 no se observa este efecto inhibitorio del etanol (Oak et al., 2006).

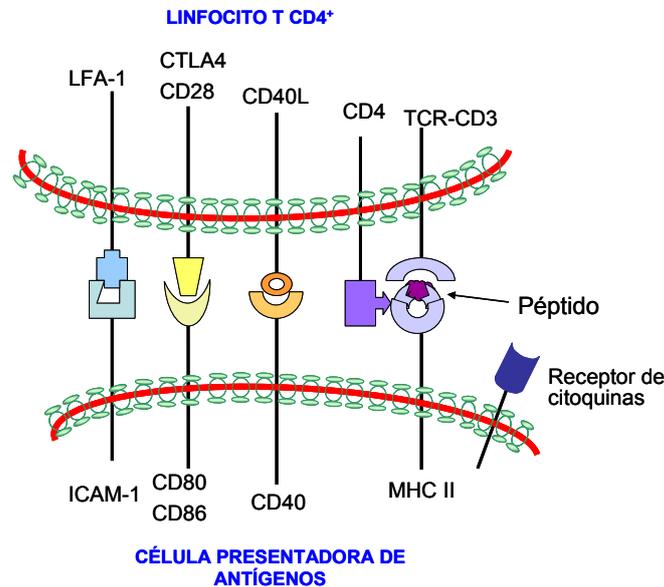
El tratamiento agudo de etanol también modula la respuesta inmunitaria adquirida. Se ha observado que éste es capaz de disminuir la presentación antigénica en macrófagos (tanto humanos como de ratón), la proliferación de los linfocitos T y provoca un descenso en los niveles de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la estimulación con superantígenos (Szabo et al., 2004; Szabo et al., 1995). Las células dendríticas son más sensibles a los efectos del etanol sobre su capacidad de presentación antigénica. Dosis moderadas de etanol afectan a la diferenciación y maduración de las células dendríticas *in vitro* y a la proliferación de linfocitos T. En células dendríticas estimuladas por LPS se produce un descenso en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y una disminución en la secreción de IL-12 acompañado de un aumento de la citocina anti-inflamatoria IL-10 (Lau et al., 2006; Mandrekar et al., 2004).

Contrariamente al efecto supresor del etanol sobre el sistema inmunitario innato, su consumo crónico parece provocar un proceso

inflamatorio continuado y dañino. Su consumo prolongado se ha relacionado con la aparición de hígado graso, peroxidación lipídica y producción de especies reactivas de oxígeno, pudiendo llegar a desarrollar hepatopatía alcohólica. Esta patología se asocia con un reclutamiento masivo de células inflamatorias (neutrófilos, leucocitos, monocitos y macrófagos) y la activación de hepatocitos (Nagy, 2003). El TLR4 y el inicio de su vía de señalización, como la inducción de MAPK y de NFκB en otros, juegan un papel fundamental en la activación y progresión de esta enfermedad (Mandrekar and Szabo, 2009; Uesugi et al., 2001). El etanol es capaz de aumentar la respuesta del LPS en células de Kupffer (Enomoto et al., 2001) y en hepatocitos (Valles et al., 2003). El daño hepático producido por el consumo crónico de etanol se evita en ratones deficientes en TLR4, aunque no se elimina en ratones deficientes en la proteína adaptadora MyD88, por lo que otras proteínas adaptadoras podrían estar implicadas (Hritz et al., 2008). Además de los efectos en hígado, existen trabajos clínicos que indican un aumento en los niveles séricos de citocinas proinflamatorias en alcohólicos con daño hepático (Khoruts et al., 1991). Datos de nuestro laboratorio también demuestran que el consumo crónico de etanol en rata induce un aumento en los niveles de IL-1β y TNF-α en suero y que es capaz de activar la vía IRAK/MAPK/NFκB en hígado y hepatocitos. Estos resultados sugieren que el etanol podría activar las vías de señalización asociadas a los receptores IL-1RI/TLR4, causando daño inflamatorio en hígado (Valles et al., 2003).

La exposición crónica al etanol, tanto en humanos como en modelos animales, provoca alteraciones en la respuesta inmunitaria adquirida (Lau et al., 2009). A pesar de la mayor susceptibilidad a padecer infecciones, paradójicamente se ha descrito un aumento en la activación de células T en humanos alcohólicos (Cook et al., 1995) y en ratones con consumo crónico (Cook et al., 2004; Song et al., 2002). Cuando se produce la activación de una célula presentadora de antígenos, como los macrófagos activados por

el LPS, IFN- $\gamma$  o por el receptor CD40, se produce un aumento de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 del macrófago, lo que permite la unión con CD28 del linfocito T y así activar su respuesta (Figura 10).



**Figura 10. Esquema de algunas interacciones entre los linfocitos T con células del sistema inmunitario innato.** Las células presentadoras de antígenos procesan al antígeno y lo presentan a los linfocitos para iniciar la respuesta inmunitaria adquirida. Si aumenta la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 de la célula presentadora de antígenos, se une a CD28 y favorece la activación de las células T (Cook et al., 2004).

Se ha observado que macrófagos procedentes de ratones alcoholizados con etanol al 20% (v/v) adicionado a la bebida durante 4-12 semanas, tienen elevados los niveles de expresión de CD80 y CD86, comparados con ratones no alcoholizados y, por otro lado, los macrófagos CD80<sup>+</sup> y CD86<sup>+</sup> presentan altos niveles de MHC-II, lo que refleja una activación de la respuesta inmunitaria. Además, los macrófagos procedentes de ratones alcohólicos secretan niveles mayores de NO y otras citocinas proinflamatorias en respuesta a su estimulación (Zhu et al., 2004).

Contrariamente a estos resultados, se ha descrito un descenso en las citocinas pro-inflamatorias y un aumento en las anti-inflamatorias secretadas por células dendritas procedentes de ratones alcoholizados con la dieta de Lieber-DeCarli durante 11 días cuando se inducen con OVA (Heinz and Waltenbaugh, 2007).

#### **1.4. ALCOHOL Y NEURODEGENERACIÓN**

El consumo de alcohol se ha asociado con alteraciones en la estructura, fisiología y función del cerebro. Se ha observado una reducción en el peso y atrofia de cerebros de alcohólicos comparado con cerebros de personas que no consumen alcohol, posiblemente debido a la pérdida de materia blanca (Harper, 1998). Existe una pérdida de neuronas en ciertas regiones del cerebro tales como la corteza, el hipotálamo y el cerebelo, produciéndose una atrofia del cerebelo característica que comúnmente se asocia con el abuso de alcohol. También se han descrito modificaciones en dendritas y en las conexiones sinápticas y un descenso en la expresión de genes asociados a mielina, que podrían explicar los cambios funcionales y el déficit cognitivo observado en estos pacientes. En cuanto a los cambios funcionales, se ha observado en personas con dependencia del alcohol una disminución de las funciones neurológicas: dificultad en la resolución de problemas abstractos, en el lenguaje verbal y la visión espacial, fallos en la memoria y funciones motoras (Harper and Matsumoto, 2005). Estos cambios en el comportamiento suelen revertir cuando se producen episodios de abstinencia, así como una recuperación del volumen del cerebro perdido (Pfefferbaum et al., 1995). Por otra parte, el alcoholismo se ha asociado con una mayor probabilidad de padecer ciertas patologías como esquizofrenia, depresión, encefalopatía hepática y síndrome de Wernicke-Korsakoff (Harper and Matsumoto, 2005). El examen postmortem de tejido cerebral de alcohólicos muestran edema cerebral, pérdida neuronal y disfunción de la barrera hematoencefálica que se asocia con un

aumento en el riesgo de padecer hemorragias y daño isquémico (Reynolds et al., 2003).

Los mecanismos por los cuales el etanol es capaz de generar todos estos cambios en el SNC son complejos. Por una parte, el consumo de alcohol agudo inhibe la función del receptor de NMDA (N-metil D-aspartato) que es un canal catiónico no selectivo cuya activación aumenta la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. El consumo crónico aumenta la sensibilidad de este receptor, lo que aumenta la vulnerabilidad a que el glutamato induzca citotoxicidad. Además se produce un aumento en el  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que se relaciona con un aumento de radicales libres. Por otra parte, el consumo de folato en los alcohólicos está disminuído, lo que provoca que se acumule homocisteína (el catabolismo de homocisteína a metionina requiere folato) que podría ser neurotóxica. Otras alteraciones observadas en alcohólicos son: una disminución de los factores tróficos, un aumento de degeneración neuronal que se relaciona con un fallo en la reparación del DNA, una alteración en el proceso de mielinización y una deficiencia en tiamina que altera el metabolismo de la glucosa, la función mitocondrial y el metabolismo oxidativo (Guerrini et al., 2009; Harper and Matsumoto, 2005). El estrés oxidativo inducido por el daño mitocondrial se ha relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o esclerosis lateral amiotrópica (Lin and Beal, 2006), aunque los mecanismos por los que el etanol produce el estrés oxidativo no se conocen. Haorah y col (2008), utilizando cultivos de neuronas sugieren que el metabolismo del etanol por la alcohol deshidrogenasa o el citocromo P-450 (isoforma CYP2E1) podrían generar especies reactivas de oxígeno y NO que causarían daño neuronal (Haorah et al., 2008).

Recientemente se ha propuesto que el etanol es capaz de inducir la producción de citocinas e inducir neuroinflamación y contribuir a la neurotoxicidad (Crews and Nixon, 2009; Sullivan and Zahr, 2008). Una característica fundamental de la neuroinflamación es la activación de células gliales, especialmente microglía y astrogliá, que producen compuestos pro-

inflamatorios y tóxicos que desencadenan una respuesta inflamatoria y daño cerebral. Varios trabajos corroboran esta hipótesis. Usando modelos animales se ha observado que el suministro de 10 dosis de etanol intraperitonealmente en días consecutivos aumentan los niveles de TNF $\alpha$  no sólo en hígado, sino también en cerebro. Además se ha observado que, suministrando una dosis de LPS tras el tratamiento con etanol, éste potencia la respuesta del LPS induciendo un incremento de MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos), TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en hígado, suero y cerebro y se produce una activación de la microglía (Qin et al., 2008). La activación de la microglía y los niveles de citocinas proinflamatorias se han estudiado también en humanos. Comparando un grupo control con un grupo de consumo moderado de alcohol, el análisis postmortem revela que el alcohol provoca un aumento de MCP-1 y MCP-2, así como un aumento en marcadores de microglía en la corteza cerebral (He and Crews, 2008).

El etanol parece activar una cascada pro-inflamatoria generando estrés oxidativo que, por una parte, produciría neurotoxicidad, y por otra, sería capaz de inhibir la neurogénesis. Así la secreción de citocinas proinflamatorias producidas durante el consumo de etanol y el estrés oxidativo podrían contribuir al daño inducido por el etanol en cerebro. Este aumento podría provocar un incremento en la transcripción de proteínas, aumentando la unión de NF $\kappa$ B al DNA (implicado en respuestas inmunitarias inflamatorias) y reduciendo la unión de CREB (promueven la supervivencia neuronal) (Crews and Nixon, 2009).

A pesar de que algunos trabajos han asociado el consumo de etanol con un aumento de citocinas proinflamatorias en cerebro, los mecanismos y dianas moleculares por los que el alcohol es capaz de desencadenar un aumento de citocinas y radicales libre en cerebro no están esclarecidos. Datos de nuestro laboratorio han demostrado que el consumo crónico de etanol parece activar la vía asociada a los receptores IL-1RI/TLR4, induciendo la vía IRAK/MAPK/NF $\kappa$ B en cerebro y en astrocitos lo que causaría un aumento de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en cerebro (Valles et al., 2004).

En el presente trabajo pretendemos abordar los mecanismos moleculares por los que el consumo de alcohol altera y modula el sistema innato inmunitario en macrófagos y en microglía, pudiendo así explicar la neuroinflamación y las deficiencias en la respuesta del sistema inmunitario que se observa en alcohólicos.

## **2. OBJETIVOS**



Datos anteriores de nuestro laboratorio indican que el alcohol promueve procesos inflamatorios en hígado y en cerebro y sugieren que el alcohol estimula la respuesta innata inmunitario y, en particular a los receptores TLR4 (Blanco et al., 2004; Valles et al., 2003; Valles et al., 2004). En el presente trabajo se pretende evaluar los mecanismos moleculares y celulares de los efectos inmunomoduladores del etanol analizando sus interacciones con los receptores TLR y en especial con el TLR4. Para este objetivo, además de la utilización de una línea celular de macrófagos (RAW 264.7), se utilizarán cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratón y células microgliales procedentes de animales TLR4<sup>+/+</sup> y de animales deficientes en este receptor TLR4<sup>-/-</sup>.

Además, en este trabajo se plantea evaluar la posibilidad de que el etanol, a través de la activación del TLR4 en células de microglía, promueva procesos inflamatorios en cerebro, que podrían generar un proceso de neuroinflamación, daño neuronal y neurodegeneración, tal y como se ha descrito en enfermedades neurodegenerativas (Lehnhardt et al., 2003; Streit et al., 2004).

En concreto, los objetivos que se plantean son:

- Estudiar si el etanol es capaz de promover procesos inflamatorios en macrófagos y microglía y si, a concentraciones de etanol con relevancia fisiológica, se inicia este proceso mediante la activación de la cascada de señalización asociada al TLR4.
- Investigar el mecanismo molecular de la acción del etanol, a bajas y altas concentraciones, sobre los receptores TLR4, analizando sus interacciones con los microdominios de membrana *lipid rafts*.
- Evaluar, en macrófagos, si el etanol interfiere en la activación del receptor TLR4 inducida por su ligando, el LPS, lo que explicaría el aumento a padecer infecciones en alcohólicos.
- Investigar el efecto del etanol sobre la activación de las células de la microglía y el papel de los TLR4 en dicha activación. Para ello se

utilizarán ratones tanto normales como con deficiencia en la función del receptor TLR4.

- Analizar si la activación de la microglia inducida por el etanol produce muerte neural, investigando el papel del receptor TLR4 en la neurotoxicidad.
- Evaluar el efecto del etanol sobre la inmunidad adquirida, estudiando su influencia en la presentación antigénica en los macrófagos.
- Estudiar la posible participación de otros receptores de la familia TLR, como el TLR2, en las acciones que ejerce el etanol en la microglía.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3.1. ANIMALES

En este trabajo se han utilizado ratas Wistar (Harlan Ibérica) adquiridas con un peso entre 200-250 g, ratones C57BL/6 (Harlan Ibérica) y ratones deficientes en el receptor TLR4<sup>-/-</sup> (con fondo genético C57BL/6) cedidos por el Dr. S. Akira. A los ratones TLR4<sup>-/-</sup> se les ha sustituido la región transmembrana y citoplasmática del receptor de tal forma que no responden a su ligando, LPS (Hoshino et al., 1999).

Todos los animales se han criado bajo condiciones controladas SPF (libres de gérmenes patógenos), con ciclos de luz/oscuridad (12/12h), temperatura de 23 °C y humedad del 60%. Para la obtención de crías, las hembras preñadas se separaron y se mantuvieron en jaulas aisladas durante el periodo de gestación. El mantenimiento de los animales se realizó en el estabulario de mamífero inferior del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

### 3.2. CULTIVOS CELULARES

Todas las operaciones se llevan a cabo en condiciones de esterilidad, en cámara de flujo laminar vertical (Faster Bio48). Todos los reactivos y medios de cultivo utilizados proceden de Gibco. El material de plástico utilizado es estéril, las placas petri para cultivo de la casa Orange Cientific, los tubos de la casa Corning, las jeringuillas de la casa BD y los filtros de la casa Millipore y Orange Cientific; el material de vidrio utilizado es estéril. Todos los materiales empleados están libres de toxinas. Las células se mantienen en una estufa de cultivos a 37°C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO<sub>2</sub> (incubador de CO<sub>2</sub> de Heraeus, modelo Heracell).

#### 3.2.1. Cultivo de células RAW 264.7

La línea celular de macrófagos de ratón RAW 264.7 (Ref. TIB-71) utilizada en este trabajo se ha obtenido de la ATCC (*American Type Culture Collection*). Esta línea celular se obtuvo a partir de tumores de ratón

inducidos mediante la administración del virus de la leucemia de Abelson (Raschke et al., 1978). Estas células fueron cultivadas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) suplementado con suero bovino fetal descomplementado (SBF) al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM. La descomplementación del suero se realiza por tratamiento durante 30 min a 60°C en un baño termostático de agua. Las células se subcultivaron regularmente para mantener un crecimiento exponencial.

Los experimentos se realizaron con las células entre el pase 5 y pase 20. Para ello, se disoció la monocapa celular de placas con un 70-80% de confluencia con 0,25% tripsina-EDTA 0,25 mM a 37°C durante 5 min. Las células RAW 264.7 se sembraron en placas 100 mm de diámetro o placas de 12 pocillos haciendo una dilución 1/10 en el medio de cultivo. Tras 24 h de la siembra, se procedió a su estimulación.

### **3.2.2. Aislamiento de macrófagos peritoneales**

El cultivo de macrófagos de ratón se obtuvo a partir de ratones machos C57BL/6J. Para su aislamiento, los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical y se inyectó una solución de sacarosa 0,34 M en la cavidad peritoneal. Tras masajear el abdomen del animal, se recuperó el lavado peritoneal. Las células se sembraron a una densidad de  $6 \times 10^5$  células/ml en placas de 12 pocillos en medio RPMI-1640 suplementado con SBF al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100 µg/ml y L-glutamina 2 mM. Para eliminar células no adherentes se cambió el medio a las 2 h. Las células se mantuvieron durante 24 h a 37°C, en la estufa de cultivos para su estabilización. Posteriormente, la pureza del cultivo se analizó por citometría de flujo con un citómetro EPICS XL y utilizando como marcador de macrófagos el anticuerpo F4/80 conjugado con Alexa Fluor 647.

### 3.2.3. Cultivo primario de células microgliales

De acuerdo al trabajo de Giulian y Baker (Giulian and Baker, 1986), los cultivos de células gliales de rata y ratón se prepararon a partir de cortezas de crías de 1-3 días de edad. Se diseccionaron las cortezas eliminando las meninges y se disgregó el tejido mecánicamente y químicamente con 0,25% tripsina-EDTA 0,25 mM a 37°C durante 30 min. La digestión se bloqueó con el mismo volumen que se había utilizado de tripsina con medio DMEM-F12 (1:1) suplementado con SBF al 14% (v/v) y deoxiribonucleasa I al 0,02% (v/v). Las células se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron a través de una malla de 90  $\mu\text{m}$  de poro. Tras la determinación del número de células, éstas se sembraron a una densidad de 250.000 células/ml, en el caso de los cultivos de rata, y de 125.000 células/ml, en el caso de los cultivos de ratón, en medio de cultivo DMEM-F12 (1:1) suplementado con SBF al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml, estreptomina 100  $\mu\text{g/ml}$ , L-glutamina 2 mM y fungizona al 1% (v/v). Este cultivo mixto de células gliales se mantuvo a 37°C a 5%  $\text{CO}_2$  durante 12 a 20 días. El medio de cultivo se cambió cada 5 días.

El cultivo de microglía se obtuvo mediante el método de tripsinización diferencial (Saura et al., 2003). Para ello el cultivo mixto de células gliales se tripsinizó durante 10-30 min a 37°C con 0,05% tripsina-EDTA 0,25mM. Con ello, se consiguió que se liberasen las células astrogiales y que permaneciesen adheridas a la superficie de cultivo las células microgliales. La pureza del cultivo fue mayor que el 98%, determinada por inmunofluorescencia usando diferentes anticuerpos frente a marcadores de microglia, astrocitos y neuronas: anti-CD11b, anti-GFAP y anti-MAP-2. Trascorridas 24 h desde el proceso de tripsinización, las células se incubaron en un medio libre de suero con suplemento N-2 al 2% (v/v) durante 18 h y se procedió a su estimulación.

### **3.2.4. Cultivo primario de neuronas corticales**

El cultivo primario de neuronas corticales de rata se preparó a partir de fetos en el día 14 de gestación (E-14) siguiendo el protocolo descrito en Pascual y Guerri (Pascual and Guerri, 2007). Las cortezas se disgregaron mecánicamente y se pasaron por una malla de 90  $\mu\text{m}$ . Las células se sembraron en placas previamente tratadas con poli-D-lisina (12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) en DMEM suplementado con SBF al 10% (v/v), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ , L-glutamina 2 mM, fungizona al 1% (v/v) y glucosa 5,5 mM. El medio de cultivo se cambió 1 h después a medio Neurobasal, que contenía: suplemento B27 (Sigma) 2% (v/v), penicilina 100 unidades/ml, estreptomycin 100  $\mu\text{g/ml}$ , L-glutamina 2 mM y fungizona al 1% (v/v). Las neuronas se estimularon tras 5 días de cultivo.

El cultivo primario de neuronas corticales de ratón se preparó a partir de fetos en el día 17 de gestación (E17). Las cortezas se disgregaron mecánicamente y se incubaron durante 15 min a 37°C en 0,25% tripsina-EDTA 0,25 mM. La tripsina se bloqueó con el mismo volumen de medio conteniendo SBF al 14% (v/v) y deoxiribonucleasa I al 0,02% (v/v). Las células se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en medio de cultivo y se pasaron por una malla de 90  $\mu\text{m}$  de poro. Se sembraron a una densidad de 1 millón células/ml y se siguió el mismo protocolo que en las neuronas procedentes de rata.

### **3.2.5. Obtención de suero de ratón**

Los ratones C57BL/6 se sacrificaron por dislocación cervical y se obtuvo la sangre mediante punción cardíaca. Las muestras se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm y se recogió el suero. Se alicuotó y almacenó a -20°C.

### 3.3. ESTIMULACIÓN DE LAS CÉLULAS Y ADMINISTRACIÓN DE ETANOL

Las células RAW 264.7 se estimularon con 50 ng/ml de LPS, con IL-1 $\beta$  (10 ng/ml), ambos de Sigma-Aldrich, o con diferentes concentraciones de etanol (Merck). En los experimentos de estímulos combinados, las células se trataron con etanol durante 2 h y, posteriormente, con LPS. Para bloquear el receptor TLR4, los macrófagos se incubaron con un anticuerpo bloqueante a una concentración de 10  $\mu$ g/ml, 40 min antes y durante el tratamiento con etanol o con LPS. Las células microgliales fueron tratadas con etanol (10, 50, 100 o 200 mM), con LPS (50 ng/ml) o con 1  $\mu$ g/ml de ácido lipoteicoico (LTA; InvivoGen) durante distintos tiempos.

Para el tratamiento agudo *in vivo*, a los ratones se les administró mediante inyección intraperitoneal suero salino (control), etanol (4g de etanol/kg de peso) al 20% en suero, 1 ó 3 dosis en días consecutivos o 1 dosis de LPS 500  $\mu$ g por ratón.

Para el tratamiento crónico de etanol *in vivo* se reemplazó el agua de los biberones por una mezcla creciente de etanol suplementada con sacarina, partiendo del 2% (v/v) hasta llegar al 10% (v/v). Los animales se mantuvieron con el 10% de etanol durante 2 semanas, 4 semanas o 5 meses. No se observaron diferencias significativas ni en el peso ni en el consumo de bebida entre los ratones alcoholizados y los controles. Tampoco se observaron diferencias en su comportamiento.

Algunos productos comerciales pueden contener cierto nivel de LPS (Weinstein et al., 2008). Para descartar la posibilidad de contaminación por LPS en el etanol que se utiliza para la estimulación de las células, se determinó el contenido de endotoxinas utilizando el test *Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate* (Cambrex Bio Science). El contenido de LPS en el etanol utilizado fue menor de  $2,98 \times 10^{-3}$  pg/ml, concentración a la cual no es capaz de activar las células.

Además, para descartar la posible presencia de endotoxinas, las células de cultivo primario de microglia se trataron con un antagonista del LPS, el sulfato de polimixina B (PMSB). Este antibiótico es un polipéptido catiónico cíclico que se une a la porción del lípido A del LPS de la superficie celular de bacterias Gram-negativas, impidiendo su acción (Lin et al., 2002). En cultivos celulares, se utilizó a una concentración de 10 µg/ml. Las células se incubaron 15 min antes y durante la estimulación con etanol 50 mM o LPS 50 ng/ml y se evaluó si este antagonista era capaz de reducir el efecto provocado por el alcohol.

### 3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Las células RAW 264.7 y las células microgliales se sembraron en placas de 12 pocillos sobre cristales. Transcurridas 24 horas después de la siembra, en el caso de las células RAW 264.7, y 18 h después de la privación de suero, en el caso de la microglía, las células se estimularon con LPS o con etanol a concentraciones bajas (10 mM) y moderadas (50 mM) durante 7 ó 24 h dependiendo del tipo celular. Las diferencias en morfología se analizaron por microscopia de contraste de fase y se registraron en una cámara digital (RICOH XR-R 3000) acoplada a un microscopio Zeiss (Axioskop 2).

### 3.5. MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN DE LA MICROGLÍA

Para estudiar la posible proliferación de la microglia, tras ser tratadas las células con etanol 50 mM, se analizó la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU). El BrdU es un análogo de la timidina capaz de sustituir esta base y marcar células que se están dividiendo (las que pueden incorporar el BrdU están en la fase S del ciclo celular). Las células microgliales se trataron con etanol durante 24 y 48 h y se incubaron con una solución de marcaje de BrdU, durante 30 min a 37°C, a una concentración final de 10 µM, siguiendo las instrucciones de un *kit* comercial de Roche Diagnostics. A continuación, las células se fijaron con etanol al 70% y se

procedió al marcaje el BrdU incubando las células con HCl 4 N durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación con un anticuerpo monoclonal anti-BrdU unido a FITC durante 45 min a 37°C. Finalmente, las muestras se analizaron en un citómetro de flujo FC500.

### **3.6. ESTUDIO DE FAGOCITOSIS EN CÉLULAS MICROGLIALES**

Las células microgliales de rata se cultivaron sobre cristales y se incubaron con esferas fluorescentes (FluoSpheres, Molecular Probes) con un diámetro de 2  $\mu\text{m}$  a un porcentaje final de 0,01% durante 30 min a 37°C. A continuación, se lavaron 4 veces con tampón fosfato salino (PBS) compuesto por: NaCl 8 g/L; KCl 0,2 g/L;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,44 g/L;  $\text{H}_2\text{PO}_4$  0,24 g/L pH 7,4 y en este caso con Ca/Mg (1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) de Gibco. A continuación, se fijaron con metanol a -20°C durante 5 min y se incubaron 1 h con lectina de tomate unida a FITC 1:500 (Sigma-Aldrich). Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 a 2,5  $\mu\text{g/ml}$  en PBS durante 10 min (Molecular Probes), las células se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (Difco) y las preparaciones se sellaron. Los resultados se recogieron con una cámara (RICOH XR-R 3000) asociada a un microscopio Zeiss (Axioskop 2). Para verificar que las esferas habían sido fagocitadas, se realizó un escáner en el eje Z de las células microgliales con un microscopio confocal Leica (modelo TCS-SP2-AOBS); de esta forma se puede evaluar si las microesferas han sido fagocitadas en el interior de las células y no se encuentran en su superficie.

### **3.7. INMUNOTRANSFERENCIA Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS**

#### **3.7.1. Obtención del lisado celular**

Tras estimular las células con etanol, LPS o LTA, éstas se lavaron con PBS frío (misma composición que en el apartado anterior, pero sin la presencia de Ca y Mg). Las células se recogieron por centrifugación a 3.800

rpm durante 5 min y se lisaron durante 30 min a 4°C con un tampón compuesto por: Tris-HCl 20 mM pH 8, Nonidet P-40 al 1% (v/v), cloruro sódico 4 mM, fluoruro sódico 40 mM, aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 40 µM, DTT 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM y PMSF 1mM. El extracto celular se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min y se recogió el sobrenadante. Se cuantificó la cantidad de proteína del extracto obtenido por el método de Bradford con el reactivo de BioRad.

### **3.7.2. Obtención de extracto nuclear en células RAW 264.7 y en microglía**

Con el fin de obtener el extracto nuclear se utilizó un método de fraccionamiento subcelular previamente descrito (Ishida et al., 2002). Para ello, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de solución I [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 mM pH 7,4, NaCl 50 mM, sacarosa 150 mM, KCl 5 mM, ditioneitol 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM y PMSF 0,1 mM), a la que se añadió Nonidet P-40 al 0,2% (v/v)]. Después de 5 min en hielo, la muestra se centrifugó a 1.000 g durante 10 min y el precipitado obtenido se resuspendió con la solución I sin detergente y se depositó suavemente sobre 1 ml de solución II [Tris-HCl 2,5 mM pH 7,4, NaCl 10 mM y sacarosa al 30% (p/v)], generando dos fases de distinta densidad. Se centrifugó nuevamente para purificar los núcleos y finalmente éstos se lisaron durante 20 min con la solución III (Tris-HCl 2,5 mM pH 7,4, NaCl 300 mM y Triton X-100 al 0,5% v/v). Todo el proceso se realizó a 4 °C.

### **3.7.3. Inmunoprecipitación**

La inmunoprecipitación se utilizó para la detección de P-IRAK-1 y P-STAT-1 en el lisado de células microgliales. Los niveles de estas proteínas fosforiladas son bajos y un análisis por inmunotransferencia no tiene la suficiente sensibilidad para su detección, por lo que fue necesario realizar un protocolo de inmunoprecipitación. Para ello, tras la lisis y cuantificación

de la proteína, 200 µg de proteína por punto experimental se incubaron con la proteína A/G-Plus unida a agarosa previamente lavada con tampón de lisis (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a 4°C en un agitador rotatorio para eliminar uniones inespecíficas. Tras eliminar la proteína A/G-agarosa por centrifugación, el lisado obtenido se incubó durante toda la noche con 2 µg de un anticuerpo primario policlonal: anti-IRAK-1 o anti-STAT-1 (Santa Cruz Biotechnology) o con suero pre-inmune (1:2.000) como control. A continuación, se añadió la proteína A/G-agarosa durante 2 h a 4°C (10 µl por cada 100 µg de proteína). Las muestras se centrifugaron a 1.000g durante 5 min y el sobrenadante se descartó. Tras varios lavados, el precipitado se solubilizó hirviendo en el tampón de carga, que contiene SDS, durante 5 min. Tras una última centrifugación, el sobrenadante se cargó en un gel de poliacrilamida y se analizó la presencia de la forma fosforilada de estas proteínas por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-P-IRAK-1 o anti-serina fosforilada para el caso de STAT-1.

#### **3.7.4. Electroforesis e inmunotransferencia**

Para la realización de la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS), cada una de las fracciones se mezclaron con tampón de carga 6x (Tris 350mM pH 6.8, glicerol al 30% (v/v), β-mercaptoetanol al 30% (v/v), SDS 100g/l y azul de bromofenol 200 mg/l). La mezcla se hirvió a 100°C durante 3 min y se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril. Para separar las proteínas mediante electroforesis, se utilizó el sistema Mini Protean de BioRad en tampón Tris 3 g/l, glicina 14,4 g/l y SDS 1 g/l a pH 8,3. Los geles se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno en tampón de transferencia [Tris 25 mM pH 8,3 , glicina 192 mM y metanol al 20% (v/v)] durante 1h a 100 V o toda la noche a 30 V a 4°C. Finalizada la transferencia, la membranas se incubaron durante al menos 1 h en leche desnatada 5% (p/v) en el tampón de lavado TBS (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) con Tween-20 0,1% (v/v) para bloquear las uniones inespecíficas. Posteriormente, las membranas se

incubaron durante toda la noche a 4 °C con el correspondiente anticuerpo primario (Tabla II) y, tras varios lavados, con un anticuerpo secundario apropiado (Tabla III). Las proteínas se visualizaron con un conjugado de fosfatasa alcalina o con un sistema quimioluminiscente (ECL Plus de Amersham Pharmacia Biotech). Para cuantificar la densidad de las bandas se utilizó un software, Alphamager 2200 (Alpha Innotech Corporation). En algunos casos se eliminaron los anticuerpos de las membranas con un tratamiento de glicina 200 mM pH 2,5 y SDS al 0,4% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente y a continuación, se bloquearon y se incubaron de nuevo con otros anticuerpos.

### **3.7.5. Transferencia en gota**

Para la detección del gangliósido GM1 de membrana en distintas fracciones de un lisado de proteínas, se empleó la subunidad B de la toxina colérica (CT-B), que se une específicamente a esta glicoproteína. Únicamente se quiere determinar la presencia o ausencia del gangliósido GM1 en las distintas fracciones. Un método rápido es la transferencia en gota. Se depositó una gota de cada lisado sobre una membrana de nitrocelulosa y se dejó que se secase a temperatura ambiente. A continuación se incubó con la CT-B unida a peroxidasa (Sigma-Aldrich) y tras varios lavados, se visualizaron las proteínas con el sistema quimioluminiscente, ECL Plus.

### **3.7.6. Electroforesis en condiciones nativas**

Para la detección de la formación del dímero de IRF3, las células se lisaron como se ha descrito anteriormente. Las muestras se prepararon para la electroforesis con un tampón de carga 6x compuesto por: Tris 350 mM pH 6,8, glicerol 30% (v/v) y azul de bromofenol 200 mg/l).

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 10% en ausencia de SDS y se enfriaron previamente en una cámara a 4°C. En ausencia de muestra se aplican 15 mA durante 20 min y 4°C y, una vez cargadas las

muestras, se desarrolla la electroforesis a 15 mA a 4°C durante 150 min usando un tampón de electroforesis Tris-glicina (Tris 27 mM pH 8,3 y glicina 186 mM). El tiempo que se dejó desarrollar la electroforesis se determinó de forma experimental. Tras la separación de las proteínas, los geles se incubaron durante 15 min en el tampón de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3 y glicina 25 mM) al que se le añade SDS al 0,1% (p/v). A continuación se realiza la inmunotransferencia siguiendo el protocolo descrito anteriormente, detectando las formas monoméricas, diméricas y fosforiladas de IRF3.

**Tabla II. Relación de anticuerpos y diluciones utilizadas en la detección de proteínas mediante inmunotransferencia de células RAW 264.7<sup>a</sup> y de células microgliales<sup>b</sup>.**

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN INMUNOTRANSFERENCIA				
Antígeno	PM (kDa)	Organismo	Dilución	Casa Comercial
Caveolina-1 <sup>a,b</sup>	22	Conejo	1:500 <sup>a</sup> y 1:2.000 <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich
CD14 <sup>a</sup>	53-55	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
COX-2 <sup>a,b</sup>	72	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
ERK <sup>1/2</sup> <sup>a,b</sup>	42-44	Conejo	1:1.000 <sup>a</sup> y 1:2.000 <sup>b</sup>	Santa Cruz Biotechnology
P-ERK <sup>1/2</sup> <sup>a,b</sup>	42-44	Ratón	1:1.000 <sup>a</sup> y 1:2.000 <sup>b</sup>	Santa Cruz Biotechnology
Flotilina-1 <sup>a,b</sup>	45	Conejo	1:250	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH <sup>a,b</sup>	36	Ratón	1:20000	Santa Cruz Biotechnology
H3 acetilada <sup>b</sup>	17	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
H4 acetilada <sup>b</sup>	11	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
IL-1RI <sup>a</sup>	80	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology

ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS EN INMUNOTRANSFERENCIA				
Antígeno	PM (kDa)	Organismo	Dilución	Casa Comercial
P-IRAK (Ser 376) <sup>b</sup>	81	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
IRAK-1 <sup>a</sup>	100	Ratón	1:200	Transduction Laboratories
IRAK-1 <sup>b</sup>	80	Conejo	1µg /100µg	Santa Cruz Biotechnology
IRF-1 <sup>b</sup>	48	Conejo	1:200	Santa Cruz Biotechnology
IRF-3 <sup>b</sup>	50	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
P-IRF3 (Ser <sup>396</sup> ) <sup>b</sup>	50	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
JNK <sup>a,b</sup>	46-54	Conejo	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
P-JNK <sup>a,b</sup>	46-54	Ratón	1:50	Santa Cruz Biotechnology
lamina A/C <sup>a,b</sup>	70	Conejo	1:1000	Cell Signaling Technology
NFκβ-p65 <sup>a,b</sup>	65	Conejo	1:50	Santa Cruz Biotechnology
MyD88 <sup>a,b</sup>	35	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
p38 <sup>a,b</sup>	38	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
P-p38 <sup>a,b</sup>	38	Ratón	1:200	Santa Cruz Biotechnology
P-Serina <sup>b</sup>	-----	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology
STAT-1 <sup>b</sup>	48	Conejo	1µg /100µg	Cell Signaling Technology
TLR2 <sup>b</sup>	90	Conejo	1:100	Santa Cruz Biotechnology
TLR4 <sup>a,b</sup>	110	Cabra	1:50	Santa Cruz Biotechnology
TRAF6 <sup>a, b</sup>	60	Conejo	1:500	Santa Cruz Biotechnology

Tabla III. Relación de anticuerpos secundarios utilizados.

ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS		
Anticuerpo	Dilución	Casa Comercial
Anti-cabra-HRP	1:10.000	Sigma-Aldrich
Anti-conejo-HRP	1:20.000	Sigma-Aldrich
Anti-ratón-HRP	1:1.000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-ratón-fosfatasa alcalina	1:1000	Sigma-Aldrich

### 3.8. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS

#### 3.8.1. Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10

Tanto las células RAW 264.7 como las células microgliales se estimularon con etanol o LPS durante 18 y 24 h en el caso de los macrófagos, y durante 7, 24 y 48 h en caso de la microglía. A estos tiempos, se tomó el medio de cultivo y se mantuvo congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta que la realización el ensayo. Los niveles de citocinas se determinaron mediante de un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) utilizando kits comerciales y siguiendo los protocolos recomendados en las especificaciones de los kits.

Para la detección de TNF- $\alpha$  e IL-10 en los medios de cultivo de las células RAW 264.7 se utilizaron kits de Diaclone Research que detectan estas citocinas procedentes de ratón y para IL-1 $\beta$  se utilizó el kit RayBiotech, ambos suministrados por Bionova Científica. Para la detección de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  secretados por las células de microglía se emplearon kits de ELISA para estas citocinas procedentes de rata de Diaclone Research (Bionova Científica).

#### 3.8.2. Medida de la concentración de nitritos

La acumulación de nitritos en el medio de cultivo se determinó a través de la reacción colorimétrica de Griess. El reactivo de Griess se preparó mezclando volúmenes iguales de sulfanilamida al 1% (p/v) en ácido

acético al 30% y N-(1-Naftil) etilendiamina diclorhidrato al 0,5% (p/v) en ácido acético al 60% (v/v). Tras incubar 100  $\mu$ l de medio de cultivo procedente de células tratadas y no tratadas con 100  $\mu$ l de reactivo durante 10 min, se determinó la concentración de nitrito midiendo la absorbancia a 540 nm. Como patrón se utilizó el nitrato de sodio.

### **3.8.3. Determinación de los niveles de TNF- $\alpha$ , NO e IL-10 en la cavidad peritoneal**

Ratones C57BL/6 y ratones deficientes en el receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) se trataron con suero o con etanol (4g/ kg de peso al 20%). Después de 7 h, 1, 3 ó 6 días de la estimulación, se sacrificaron. Para la determinación de TNF- $\alpha$  y NO en la cavidad peritoneal se inyectó 1 ml de PBS seguido de un masaje para facilitar su distribución a través del peritoneo. El PBS se recuperó, se centrifugó a 1.000 g durante 5 min recogiéndose el sobrenadante para determinar la cantidad de TNF- $\alpha$  e IL-10 mediante ELISA (con el kit de Diaclone Research) y de NO mediante la reacción de Griess previamente descrita.

## **3.9. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS DE NEURONAS CORTICALES DE RATA Y RATÓN**

### **3.9.1 Análisis de apoptosis de neuronas**

Para analizar si las citocinas liberadas al medio tras la activación de la microglía producida por el etanol pueden inducir apoptosis en neuronas corticales, se estimuló la microglía de rata y de ratón, deficiente o no en TLR4, con etanol (50 mM) durante 24 y 48 h. El medio de cultivo se separó y se congeló a -80°C hasta su empleo.

Las neuronas se cultivaron *in vitro* durante 5 días, tras los cuales se procedió al estudio de la inducción de apoptosis con el medio condicionado de microglía obtenido anteriormente. Las neuronas se cultivaron con el medio condicionado durante 1 ó 2 días, medio de microglía procedente de

rata en neuronas de rata y medio procedente de microglía de ratones deficientes y no en TLR4 en neuronas de ratones TLR4<sup>+/+</sup>, y se analizó la apoptosis por citometría de flujo. La apoptosis temprana se cuantificó mediante el marcaje con anexina V marcada con ficoeritrina y 7-AAD (7-amino-actinomicina D), ambos de Molecular Probes. 7-AAD es un fluoróforo que se intercala en la doble hélice del DNA pero en células viables, no penetra en la célula. Este doble marcaje permite distinguir la población apoptótica (anexina V positiva) y la necrótica (7-AAD positiva). Durante los estadios iniciales del proceso apoptótico, la fosfatidilserina (fosfolípido normalmente ubicado en la capa interna de la membrana plasmática) se transloca al exterior de la membrana, quedando expuesta para su interacción con anexina V. La anexina V se une con gran afinidad a la fosfatidilserina expuesta permitiendo reconocer las células apoptóticas.

Para la detección de la apoptosis, las neuronas se lavaron con tampón Hepes 10 mM pH 7,4, conteniendo NaCl 140 mM y CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM y se resuspendieron en 100 µl de dicho tampón. A continuación se añadieron los fluoróforos: 3 µl de anexinaV conjugada con ficoeritrina y 1µg/ml de 7-AAD (ambos de Molecular Probes) incubando 15 min en oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo diluyendo con tampón hasta 500 µl y, tras incubar en hielo 3 min, se analizaron las células por citometría de flujo. Se utilizó el canal FL2 para la fluorescencia naranja, y FL4 para la roja, previamente compensados para evitar solapamientos. Se empleó el citómetro FC500 de Beckman Coulter y el programa Cytomics RXP Analysis para el análisis de los datos.

### **3.9.2 Determinación de la concentración de etanol en el medio de cultivo**

Para comprobar el contenido residual de etanol en el medio condicionado se determinaron sus niveles con el kit de Sigma-Aldrich basado en una reacción enzimática en la que intervienen el dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH).

Esta enzima cataliza la oxidación del etanol presente en el medio a acetaldehído, utilizando el NAD de cofactor y obteniendo NADH. Se determinó la absorbancia del NADH a 340 nm que es proporcional a la cantidad de etanol presente.

Las neuronas se incubaron con medio control de microglía y con el medio al que se añadió la misma cantidad de etanol que contenía el medio condicionado y se analizó la apoptosis mediante el marcaje con anexina-V descrito anteriormente.

### **3.10. AISLAMIENTO DE MICRODOMINIOS DE MEMBRANA *LIPID RAFTS***

#### **3.10.1 Aislamiento de *lipid rafts* de células RAW 264.7**

Para el aislamiento de los *lipid rafts* en la línea celular de macrófagos, se utilizó una metodología basada en que estos microdominios son resistentes a la lisis con Tritón X-100 al 1% (v/v) a 4°C y su posterior separación con un gradiente de densidades. Específicamente, las células RAW 264.7 fueron estimuladas con LPS, IL-1 $\beta$  o etanol 10, 50 o 200 mM durante 30 min. Posteriormente se lisaron en el tampón empleado en la lisis celular (apartado 3.7.1) en el que el detergente NP-40 fue sustituido por Tritón X-100 al 1% (v/v). Se generó un gradiente de densidades con el uso de OptiPrep (Sigma), un producto comercial diseñado para generar gradientes de densidades compuesto por una solución al 60% de iodixanol en agua. El lisado celular se mezcló con el mismo volumen de una disolución de OptiPrep al 35% y se colocó en el fondo de un tubo de centrifuga. Sobre él se añadió 1 ml de OptiPrep al 30%, 1 ml al 25%, 1 ml al 20% y 500 $\mu$ l de tampón de lisis. Se centrifugaron a 200.000 g durante 4 h a 4°C. Se recogieron las fracciones del gradiente de 0,6 ml empezando por las de la parte superior del tubo, las menos densas. Posteriormente, cada una de las fracciones se mezcló con tampón de carga 6x y las

proteínas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron por inmunotransferencia.

En algunos experimentos se utilizaron agentes que disgregan los *lipid rafts*, saponina y estreptolisina-O. Para los ensayos con saponina, este compuesto se añadió al tampón de lisis a una concentración final de 1% y en el caso de la estreptolisina-O, las células se trataron con este agente a una concentración de 500 ng/ml durante 2 h antes de la estimulación con LPS.

### **3.10.2 Separación de las fracciones solubles e insolubles en Triton X-100**

Para el estudio del papel de los *lipid rafts* en células microgliales se utilizó un procedimiento más simplificado. Puesto que la separación de los *lipid rafts* en gradiente de densidades necesita partir de una gran cantidad de células, se empleó un protocolo descrito anteriormente para este tipo de cultivo primario (Kim et al., 2006).

Este método consiste en tratar las células con Tritón X-100 al 1% (v/v) a 4°C y centrifugar separando las fracciones insolubles a este detergente que contienen los *lipid rafts* (precipitado), mientras que el sobrenadante contiene las proteínas no asociadas a estos microdominios.

Las células microgliales procedentes de rata se estimularon con etanol 50 mM durante distintos tiempos. Las monocapas se recogieron y se lisaron durante 30 min a 4 °C en un tampón Hepes 10 mM pH 7,5, que contiene NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, PMSF 0,5 mM y Triton X-100 al 1%. Posteriormente se centrifugaron a 12.000 g 30 min a 4°C y se recogió el sobrenadante como fracción soluble a Tritón X-100 . El sedimento se lavó una vez con 1 ml de tampón de lisis sin Tritón X-100 y a continuación se procedió a realizar una lisis más agresiva con una mezcla de detergentes para poder solubilizar las proteínas presentes en esas fracciones de membrana. Para ello se utilizó un segundo tampón de lisis: Tris 50 mM pH 7,4 que contiene SDS al 0,1% (p/v), deoxicolato sódico al 0,5% (p/v), NP-40

al 1% (v/v), EDTA 1mM, EGTA 1mM, PMSF 2mM, leupeptina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml y Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1mM. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 12.000 g durante 30 min a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes con las proteínas presentes en la fracción resistente a detergentes. Posteriormente se analizó la presencia de varias proteínas de interés mediante la técnica de inmunotransferencia.

### **3.11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD**

Se aislaron los macrófagos peritoneales de ratones sometidos a distintos tratamientos. Tras 24 h, se lavaron con un tampón que contenía: PBS pH 7,2 con SBF 1% (v/v) y azida sódica al 0,1% (p/v). Posteriormente las células se incubaron con suero de ratón C57BL/6 al 5% (v/v) durante 30 min a 4°C, para bloquear las uniones inespecíficas, obtenido como se ha descrito previamente en el apartado 3.2.5. A continuación, se añadieron los anticuerpos unidos a un fluorocromo y se mantuvieron las muestras a 4°C durante 30 min en oscuridad. Los anticuerpos utilizados reconocían los siguientes antígenos de superficie: F4/80 (marcador de macrófagos) se utilizó conjugado con Alexa Fluor-647, a una concentración final de 1 µg/ml (Caltag Laboratories); H-2K<sup>d</sup> (marcador de MHC de clase I) se empleó unido a ficoeritrina (PE) a 3 µg/ml; I-A<sup>d</sup> (marcador de MHC de clase II) se utilizó unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC), a una concentración de 5 µg/ml; CD80 (también denominado B7-1) unido a PE y se utilizó a una concentración de 3 µg/ml y CD86 (B7-2) conjugado con FITC, a 5 µg/ml. Estos últimos anticuerpos se obtuvieron de la casa comercial BD Pharmingen.

Tras la incubación con los anticuerpos, la células se lavaron y se resuspendieron en 100 µl de tampón y se analizaron en un citómetro de flujo FC500 de Beckman Coulter. Se estudió la población positiva y la intensidad

del marcaje respecto a los eventos F4/80 positivos con el programa Cytomics RXP Analysis.

### **3.12. INMUNOFLOURESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL**

#### **3.12.1. Estudio de la expresión y localización del TLR4 y TLR2**

Las células de microglía procedentes de rata se sembraron en cubreobjetos de 15 mm de diámetro. Tras la estimulación con etanol (50 mM) o LPS (50 ng/ml) o LTA (1 µg/ml) durante 5, 10 ó 30 min, las células se fijaron con paraformaldehído al 3,7% (v/v) (Electron Microscopy Sciences) durante 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron varios lavados con PBS (con Ca/Mg de Gibco) y se bloquearon las uniones inespecíficas con una solución de BSA al 3 % (p/v) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti-TLR2 obtenido en conejo (1:50, Santa Cruz Biotechnology), anti-TLR4 obtenido en cabra (1:50, Santa Cruz Biotechnology), anti-caveolina-1 (1:200, Abcam) o anti-flotilina (1:100, BD Transduction Laboratories), obtenidos ambos en ratón.

La incubación con los anticuerpos secundarios se realizó en dos pasos para evitar que se produzca una interferencia de los secundarios. Tras varios lavados las células se incubaron durante 90 min a 37°C en una cámara húmeda con un anticuerpo anti-cabra unido a FITC (1:100; Jackson ImmunoResearch) y con un anti-ratón unido a AlexaFluor 647 (1:500; Invitrogen), los dos obtenidos en mono. Tras varios lavados se realizó la incubación con un anticuerpo anti-conejo (obtenido en cabra) conjugado con AlexaFluor 405 (1:500; Invitrogen) durante 90 min a 37°C en una cámara húmeda. Después de varios lavados, las células se montaron con un medio de montaje para fluorescencia (Difco) y las preparaciones se sellaron. Las imágenes se analizaron utilizando el microscopio confocal de Leica modelo TCS-SP2-AOBS y se cuantificó la intensidad de fluorescencia y la colocalización con el software de análisis de imágenes Meta Imaging Series 7.0.

### **3.12.2. Estudio de la expresión y localización de las moléculas MHC-I y MHC-II en macrófagos**

Los macrófagos peritoneales de ratones tratados o no con etanol se sembraron a una densidad de 300.000 células/ml sobre cristales. Después de 24 h, se fijaron con formaldehído al 3,7% (v/v) en PBS (con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) durante 20 min. Las uniones inespecíficas se bloquearon con una solución de BSA al 3 % (p/v) en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación las muestras se incubaron durante 90 min a 37°C en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios anti-caveolina-1 (1:100, Sigma-Aldrich) o con anti-flotilina-1 (1:50, Santa Cruz Biotechnology) ambos obtenidos en conejo. Tras varios lavados con PBS, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes unidos a FITC o a isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC) y con anti-H-2K<sup>d</sup> conjugado con PE (1:50, Molecular Probes) o con anti-I-A<sup>d</sup> conjugado con FITC (1:50, Molecular Probes), durante 90 min a 37°C en cámara húmeda. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33342 a 0,5  $\mu\text{g/ml}$  durante 10 min (Molecular Probes). Al finalizar estos procesos, los cristales se montaron con el medio de montaje FA (Difco). Como control negativo se siguió el mismo protocolo pero sin la incubación del anticuerpo primario. Las imágenes se analizaron utilizando el microscopio confocal de Leica modelo TCS-SP2-AOBS y se cuantificó la intensidad de fluorescencia y la colocalización con el software de análisis de imágenes Meta Imaging Series 7.0.

### **3.13. ANÁLISIS DE LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA IN VIVO: INMUNOHISTOQUÍMICA**

Se administraron 3 dosis de etanol (4 g/kg) al 20% durante 3 días consecutivos a ratones normales C57BL/6 y deficientes en el receptor TLR4. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la última administración, y los cerebros se congelaron rápidamente en nieve carbónica y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. Para los estudios de

inmunohistoquímica, los cerebros se incluyeron en el gel de corte OCT (*Optimal Cutting Temperature* de Tissue-Tek) y se realizaron secciones cerebrales coronales de 40  $\mu\text{m}$  utilizando un criostato de Leica Microsystems, modelo CM-1900. Los cortes se montaron sobre portaobjetos comerciales que habían sido previamente tratados con poli-lisina (Thermo Scientific). Para la detección del marcador de microglía CD11b, los cortes se lavaron con TBS-T, descrito en el apartado 3.7.4, y se fijaron con paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación las secciones se bloquearon durante 1 h con suero bovino al 5% en TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario, anti-CD11b (Abcam) durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C. Tras esta incubación, se realizaron lavados con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo biotinilado anti-rata (Vector). Finalmente, se empleó el método de avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector) utilizando como sustrato el 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). En presencia de peróxido de oxígeno el DAB sufre una polimerización oxidativa y por acción de la peroxidasa se produce el ciclado de la DAB que da lugar a la aparición de un precipitado marrón. Las muestras se trataron con el agente ABC durante 30 min a temperatura ambiente, y tras 3 lavados de 5 minutos con TBS-T, los cortes se incubaron con DAB. Tras la aparición del precipitado marrón, las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron utilizando sucesivos lavados con etanol al 70%, 80%, 96%, 100% y finalmente 2 lavados de 5 min en xilol. Las secciones se montaron en medio de montaje para histología (Fluka). Como control negativo se siguió el mismo protocolo, eliminando el anticuerpo primario.

Las imágenes se captaron utilizando una cámara de Leica, (modelo DFC-480) montada sobre un microscopio de la misma casa modelo DM-6000B. La intensidad de fluorescencia y colocalización se valoraron utilizando el software de análisis de imágenes Meta Imaging Series 7.0.

### **3.13. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

En la realización del trabajo experimental descrito se utilizó el programa Graph Pad (versión 4) para el cálculo de la media y la SD (desviación estándar) así como la comprobación de la significación mediante el test ANOVA de una vía seguido por un test de Dunnett cuando se comparan distintos tratamientos o tiempos respecto a la situación control. Para comparar un tratamiento respecto a otro se empleó el test ANOVA de una vía seguido por el test de Newman-Keuls. El programa Excel y Graph Pad fueron empleados para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop (versión 8.0.1) para el procesamiento de todas las imágenes.

## **4. RESULTADOS**

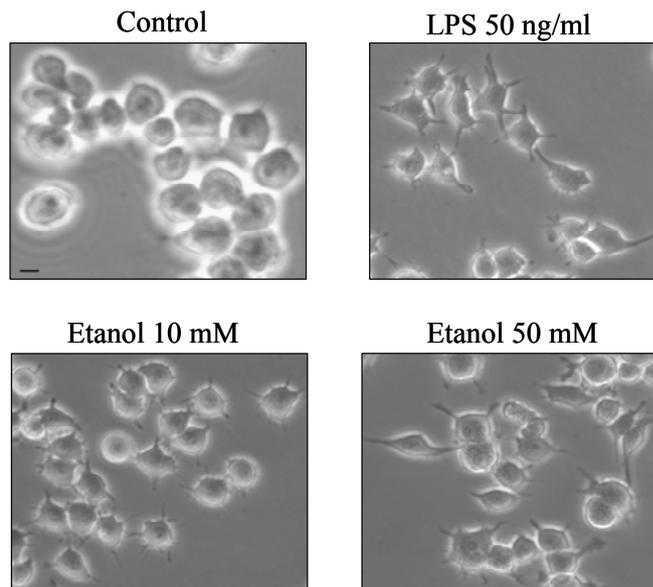


#### **4.1. EL ETANOL MODULA LA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LAS CÉLULAS RAW 264.7**

Debido al papel que juegan los macrófagos en la respuesta inmunitaria y con el fin de determinar su implicación en los procesos inflamatorios modulados por el etanol, se utilizó como aproximación para desarrollar este trabajo una línea celular procedente de macrófagos de ratón denominada RAW 264.7. Esta línea celular ha sido ampliamente utilizada en el estudio de procesos inflamatorios y, en particular, en el análisis de los efectos inducidos por el LPS, debido a que su respuesta es similar a la observada en macrófagos peritoneales de ratón (Pruett et al., 2005).

##### **4.1.1. El tratamiento con etanol induce un cambio morfológico en las células RAW 264.7**

Los macrófagos son células del sistema inmunitario con capacidad fagocítica y que pueden interaccionar con otros tipos celulares para regular su respuesta frente a patógenos. Su activación provoca cambios morfológicos. Para analizar si el etanol era capaz de activar y cambiar la morfología de los macrófagos, las células RAW 264.7, se trataron con LPS 50 ng/ml o con etanol (10 mM y 50 mM) durante 24 h. La Figura 11 muestra que ambos compuestos inducen un cambio morfológico, en el cual las células adquieren un fenotipo maduro, con pseudópodos, vesículas y una forma más poligonal.



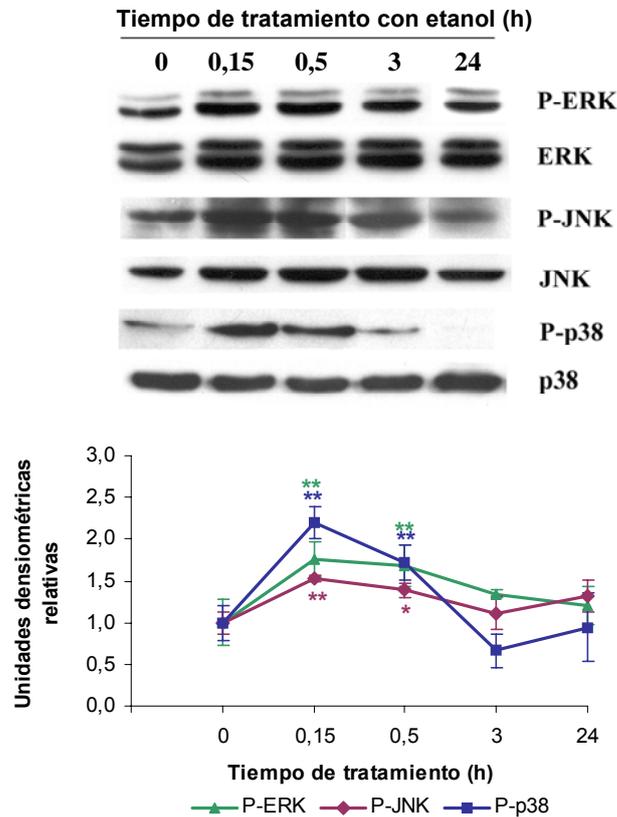
**Figura 11. Cambios morfológicos en los macrófagos RAW 264.7.** Los macrófagos fueron tratados con etanol o con LPS durante 24 h. Se muestra una micrografía característica de 5 experimentos diferentes (Barra 25 µm).

#### **4.1.2. El etanol activa las rutas de señalización de las MAPK y NF-κB**

Los macrófagos son células muy sensibles al LPS y responden activamente generando un mecanismo de defensa que incluye un proceso inflamatorio. La estimulación del receptor TLR4 por el LPS provoca una cascada de señalización en la que se incluye la activación de las MAPK y NF-κB (Akira, 2003). Con el fin de analizar si el etanol era capaz de actuar a través del receptor TLR4, se evaluó la activación de estas cascadas de señalización en células estimuladas con etanol. Con esta finalidad, los macrófagos se incubaron con etanol 50 mM y en algunos experimentos se compararon con los obtenidos con células estimuladas con LPS, ligando específico del TLR4.

Para el estudio de la fosforilación de las MAPK se analizó, mediante inmunotransferencia, la fosforilación de p38, ERK1/2 y JNK a distintos

tiempos de tratamiento. La activación de estas quinasas ocurre rápidamente, ya que a 10 y a 30 min de tratamiento se observa un incremento en sus formas fosforiladas que decrece a tiempos largos de incubación (Figura 12). Por ejemplo, a 30 min observamos un aumento de P-ERK del 75%, de P-JNK del 52% mientras que P-p38 aumenta un 120%.

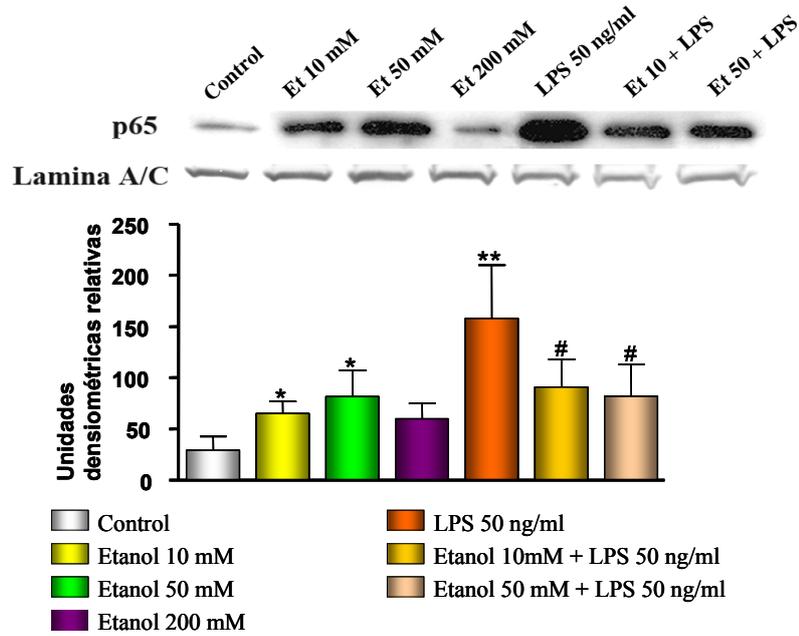


**Figura 12.** El tratamiento con etanol 50 mM produce una activación de las MAPK en las células RAW 264.7. Los macrófagos se estimularon con etanol 50 mM a diversos tiempos y se evaluaron los cambios en la expresión de las formas fosforiladas de las tres MAPK (P-ERK, P-JNK y P-p38) mediante inmunotransferencia a partir de 10 min. En el panel superior se muestra un resultado representativo de un total de 7 experimentos independientes. La cuantificación, panel inferior, corresponde a la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

El tratamiento con LPS produce una activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B que se transloca al núcleo. Por este motivo, se analizó la translocación al núcleo de p65, subunidad de NF- $\kappa$ B, en células estimuladas con etanol. Las células RAW 264.7 se trataron con varias concentraciones de etanol (10, 50 y 200 mM) o con LPS 50 ng/ml como control positivo y, tras un fraccionamiento subcelular descrito en material y métodos, se determinó la presencia de p65 en el núcleo. Como control de carga y del experimento se analizó la presencia de GAPDH (citoplasmática) y de lamina A/C (proteína nuclear) tanto en la fracción citoplasmática como la nuclear. No se detectó la presencia de GAPDH en la fracción nuclear ni la de lamina A/C en la fracción citoplasmática. La Figura 13 muestra que, tras 30 min de estimulación con concentraciones bajas (10 mM) y moderadas (50 mM) de etanol, se produce un incremento de los niveles de p65 en el núcleo, mientras que los niveles de esta proteína no sufren variaciones significativas si el tratamiento se realiza con concentraciones elevadas de etanol (200 mM).

Varios autores han descrito que el etanol disminuye la respuesta inmunitaria cuando se produce una infección (Mandrekar et al., 1999; Szabo, 1999). Sin embargo, nuestros resultados indicaban que el etanol inducía una activación de las células RAW 264.7 como respuesta a dosis agudas moderadas de etanol (figura 11-13). Para tratar de explicar esta controversia, los macrófagos se estimularon conjuntamente con etanol y con LPS y se analizaron los niveles de p65 en el núcleo (figura 13). El tratamiento conjunto con etanol y LPS provoca una disminución en el nivel de p65 en el núcleo respecto al tratamiento de LPS solo.

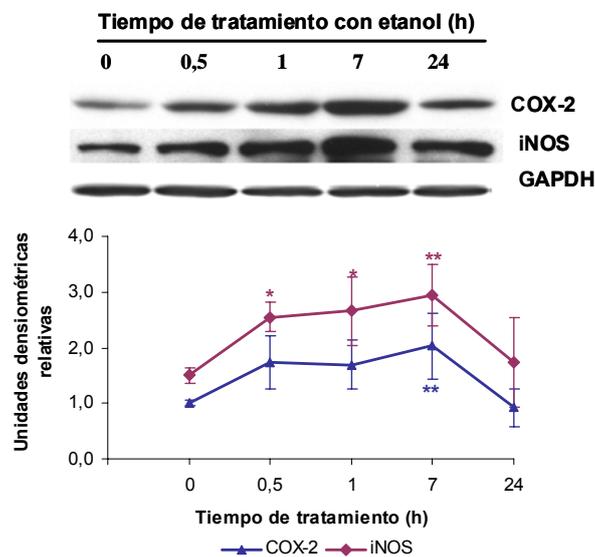
Estos resultados indican que el etanol por sí solo es capaz de iniciar una respuesta inflamatoria, sin embargo inhibe la respuesta generada por el LPS.



**Figura 13.** El LPS y el etanol aumentan los niveles de expresión de la subunidad p65 de NFκB en el núcleo. La presencia de la subunidad p65 de NFκB se evaluó en extractos nucleares. El tratamiento con concentraciones de etanol moderadas produce una translocación de p65 al núcleo, mientras que ésta no se observa con el tratamiento de 200 mM. La combinación de etanol con LPS disminuye la activación producida por el LPS. Se presenta una inmunotransferencia representativa de un total de 7 experimentos independientes. Los resultados de la cuantificación reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnett; #  $<0.05$  respecto al valor del tratamiento con LPS con un test ANOVA de una vía, seguido del test de Newman-Keuls).

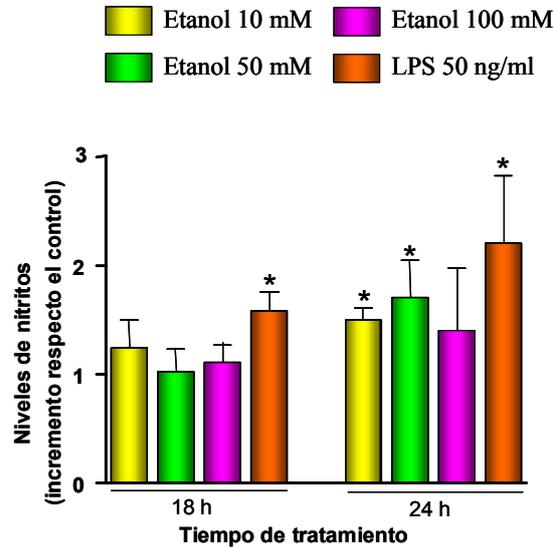
#### 4.1.3. El etanol induce la expresión de iNOS y COX-2 en las células RAW 264.7

La activación del receptor TLR4 por su ligando LPS provoca la activación de NF- $\kappa$ B, la cual induce la transcripción de genes que codifican para citocinas y mediadores inflamatorios, tales como iNOS y COX-2. Para analizar si el etanol, al igual que el LPS, inducía la expresión de estas proteínas, las células RAW 264.7 se sometieron a un tratamiento con etanol 50 mM durante distintos periodos de tiempo. Como puede observarse en la Figura 14, el etanol aumenta los niveles de expresión tanto de iNOS como de COX-2, alcanzándose el máximo nivel tras 7 h de tratamiento con etanol, para, a continuación, decrecer a las 24 h.



**Figura 14. Efecto del etanol en la expresión de COX-2 e iNOS.** Los niveles de expresión de los mediadores inflamatorios iNOS y COX-2 se analizaron a distintos tiempos de exposición a etanol 50 mM en las células RAW 264.7. En la parte superior se muestra una inmunotransferencia representativa de un total de 7 experimentos independientes. Los resultados de la cuantificación (parte inferior) reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

La inducción de iNOS normalmente se acompaña con un aumento en los niveles de NO. Para determinar la presencia de esta molécula pro-inflamatoria en células tratadas con LPS o con etanol, se determinaron los niveles de nitritos en el medio de cultivo de células RAW 264.7 tratadas con diferentes concentraciones de etanol o con LPS durante 18 y 24 h.

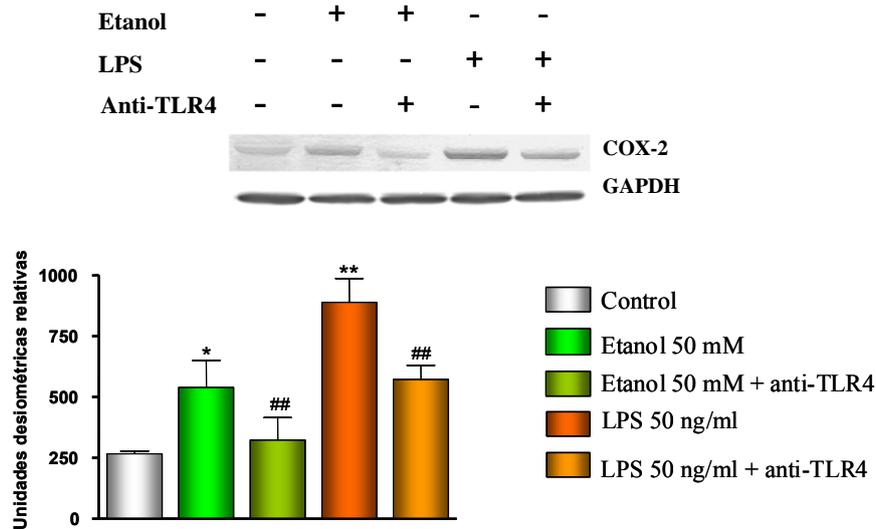


**Figura 15. Análisis de los niveles de NO tras el tratamiento con etanol y con LPS de las células RAW 264.7.** Los niveles de nitritos se evaluaron en el sobrenadante de las células tratadas con LPS (50 ng/ml) o distintas concentraciones etanol tras 18 y 24 h. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M (\* $<0.05$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía,  $n=7$ ).

La Figura 15 muestra que el tratamiento con concentraciones bajas y moderadas de etanol estimula la producción de NO tras 24 h, de igual forma a lo que ocurre con macrófagos tratados con LPS. Aunque el tratamiento con etanol a 50 mM durante 24 h activa los macrófagos generando un aumento en niveles de NO, con el tratamiento a altas concentraciones, como 100 mM, no produce cambios significativos en este mediador inflamatorio. Estos resultados sugieren que diferentes concentraciones de etanol podrían provocar diferentes respuestas en los

macrófagos. Para corroborar estos resultados en macrófagos peritoneales, tras el aislamiento de estos macrófagos del peritoneo de ratones se incubaron con 50 mM de etanol durante 24 h y se determinó la concentración de NO. Los resultados mostraron que el etanol incrementa 1,3 veces los niveles de NO sobre el control no estimulado.

Para comprobar si la inducción de los mediadores inflamatorios se producía a través de la interacción del etanol con el receptor TLR4, las células RAW 264.7 se trataron con un anticuerpo bloqueante que neutraliza a este receptor y, posteriormente se estimularon con etanol y se determinó el nivel de COX-2 (Figura 16). Los resultados muestran un incremento en el nivel de COX-2 tras el tratamiento con etanol y un descenso en el nivel de esta proteína tras bloquear el receptor TLR4, lo que refleja que la inducción de COX-2 por el etanol está mediada por la activación de dicho receptor. Este hecho queda también corroborado por el efecto del LPS (que incrementa los niveles de COX-2) y la disminución de los mismos cuando se bloquea el receptor TLR4 con el anticuerpo bloqueante.



**Figura 16. Inducción de la expresión de COX-2 a través del receptor TLR4.** La expresión de COX-2 se evaluó en el lisado de células sin incubar o incubadas con anticuerpo bloqueante del receptor TLR4 y posteriormente tratadas con etanol 50 mM o con LPS (50 ng/ml) durante 7 h. En la parte superior de la figura se muestra una inmunotransferencia representativa de un total de 5 experimentos independientes. Los resultados de la cuantificación (parte inferior) reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Dunnet; ## $<0.01$  respecto al valor del tratamiento con etanol o con LPS con un test de ANOVA de una vía, seguido del test de Newman-Keuls).

#### 4.1.4. El etanol ocasiona un incremento en la producción de IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$

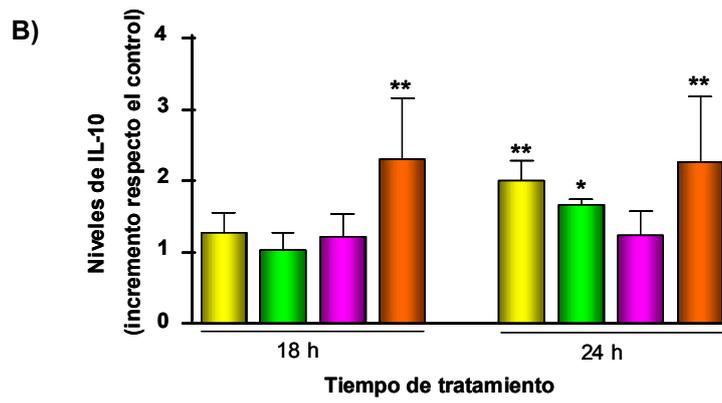
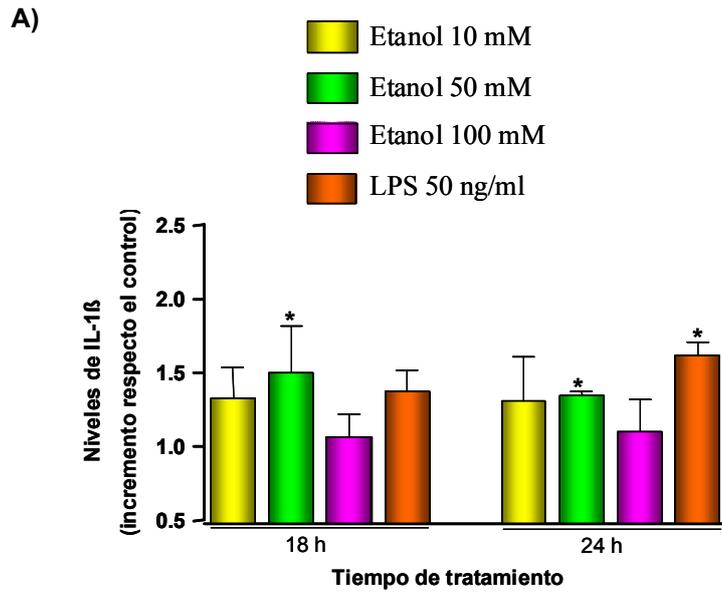
Uno de los mecanismos de defensa utilizado por los macrófagos para combatir las infecciones y poner en marcha la inmunidad adquirida es la producción de citocinas. Para estudiar si el etanol induce la secreción de citocinas al igual que lo hace el LPS, las células RAW 264.7 se trataron con etanol a distintas concentraciones o con el LPS y se determinó el nivel de IL-1 $\beta$  en el medio de cultivo tras una incubación de 18 y de 24 h.

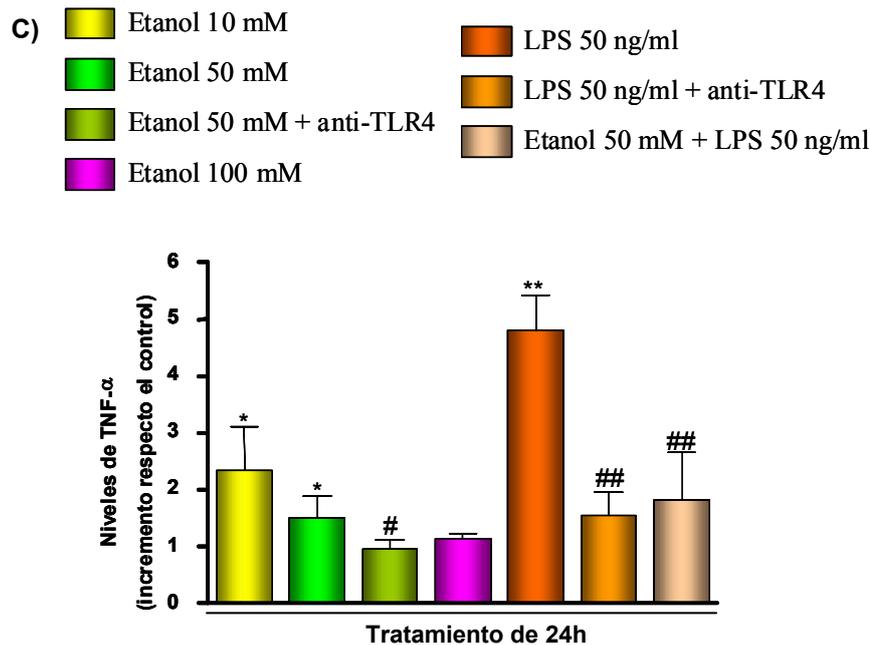
En la Figura 17.A se puede observar que, mientras el tratamiento con etanol 10 mM y 50 mM aumenta el nivel de la IL-1 $\beta$  aproximadamente

1,3 y 1,5 veces sobre el valor control, el tratamiento con 100 mM no afecta a la producción de esta citocina ni a 18 ni a 24 h. Además, en el medio de macrófagos tratados con el LPS (50 ng/ml) durante 18 h se observa un aumento de esta citocina similar al que ejerce el etanol a 10 mM. A 24 h de tratamiento el efecto del LPS es superior al ejercido por el etanol a 10 y 50 mM.

En la respuesta inmunitaria se produce un equilibrio entre moléculas pro y anti-inflamatorias. La citocina IL-10 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmunitaria (Couper et al., 2008), por lo que también se analizó su producción en la línea celular RAW 264.7. En este caso se utilizaron las mismas condiciones experimentales que para la valoración de la IL-1 $\beta$  (incubación con el LPS (50 ng/ml) o con etanol 10 y 50 mM durante 18 y 24 h). Los resultados de la Figura 17.B muestran que a las 18 h únicamente se observa un incremento significativo en los niveles de IL-10 de células tratadas con el LPS, mientras que a 24 h se obtuvieron los mismos resultados con el LPS que con el tratamiento con etanol 10 mM y 50 mM. Sin embargo, el tratamiento con altas concentraciones de etanol (100 mM) no induce cambio en los niveles de esta citocina. Es interesante señalar que el tratamiento a bajas concentraciones de etanol (10 mM) induce mayores niveles de la IL-10 que el tratamiento moderado (50 mM). Este resultado sugiere que bajas concentraciones de etanol podrían tener un efecto protector mayor frente a un daño inflamatorio que dosis moderadas, ya que esta citocina limita la producción excesiva de citocinas pro-inflamatorias.

Los cambios inducidos por el etanol y el LPS, después de 24 horas de tratamiento, sobre los niveles de TNF- $\alpha$  se recogen en la Figura 17 C. Como se puede observar, mientras el tratamiento con etanol 10 mM y 50 mM aumentan el nivel de TNF- $\alpha$  aproximadamente 2,4 y 1,8 veces sobre el control, el tratamiento con 100 mM no afecta a la producción de esta citocina.





**Figura 17. Producción de citocinas en macrófagos tratados con etanol y con LPS.** Las células RAW 264.7 se incubaron con etanol (10, 50 y 100 mM), con LPS (50 ng/ml) y se determinaron los niveles de citocinas en el medio de cultivo mediante ELISA. Valoración de IL-1 $\beta$  (A, n=7) y valoración de IL-10 (B, n=7). Los niveles de TNF- $\alpha$  (C, n=8) se analizaron tras una incubación con etanol (10, 50 y 100 mM), con LPS o con ambos. En algunos experimentos las células se incubaron con un anticuerpo bloqueante del receptor TLR4, 40 min antes y durante la estimulación. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control; # $<0.05$  y ## $<0.01$  respecto al valor del tratamiento con etanol o con el LPS).

Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento conjunto de etanol y el LPS disminuye la translocación de p65 al núcleo inducida por el LPS (Figura 13). Para analizar si el tratamiento conjunto altera los niveles de TNF- $\alpha$ , se evaluó la producción de dicha citocina en las células RAW 264.7 incubadas con el LPS junto con etanol (50mM). Los resultados

mostraron una reducción en la producción de TNF- $\alpha$  cuando se compara con su producción inducida por tratamiento con LPS solo (Figura 17.C). Estos resultados sugieren que el alcohol interfiere en la señalización del LPS, tal y como se ha descrito anteriormente (Dai and Pruett, 2006b; Pruett et al., 2004c).

Para analizar si el aumento en la producción del TNF- $\alpha$  inducida por el etanol o por el LPS estaba mediada por una activación del receptor TLR4, los macrófagos se incubaron con un anticuerpo bloqueante de receptor TLR4, 40 min antes y durante el tratamiento con etanol o con LPS. Los resultados de la Figura 17.C muestran el nivel del TNF- $\alpha$  secretado por las células y cómo el bloqueo del receptor suprime la producción de TNF- $\alpha$  inducida por etanol o por LPS, sugiriendo la participación del receptor TLR4 en la respuesta inflamatoria mediada tanto por el LPS como por el etanol.

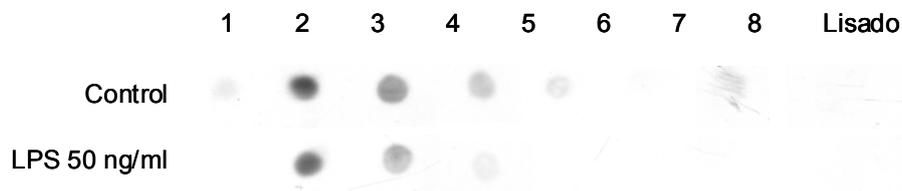
Para confirmar si este aumento de citocinas se producía también en los macrófagos peritoneales de ratón, se midieron los niveles de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de macrófagos tratados con etanol 50 mM durante 24 h. De la misma forma que ocurre en el caso de las células RAW 264.7, se observa un incremento de nivel del TNF- $\alpha$  de 1,9 veces respecto al control.

#### **4.1.5. El LPS y el etanol activan a los receptores TLR4 e IL-1RI e inducen la translocación de TLR4, IL-1RI, MyD88, IRAK y P-ERK a los *lipid rafts***

Trabajos anteriores han demostrado que, tras la estimulación con LPS, el TLR4 es reclutado en los microdominios de membrana *lipid rafts* y se produce una agrupación de este receptor que es crítica para la producción de citocinas (Triantafilou et al., 2002). Estudios anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado que el etanol actuaba a través de los receptores TLR4 e IL-1RI en astrocitos (Blanco et al., 2005). Basándonos en esos datos y en otros que indican la importancia de los *lipid rafts* en el reclutamiento y activación de los receptores TLR, la hipótesis que

propusimos es que el etanol, a través de sus interacciones con los *lipid rafts*, puede mediar la diferente respuesta del sistema inmunitario.

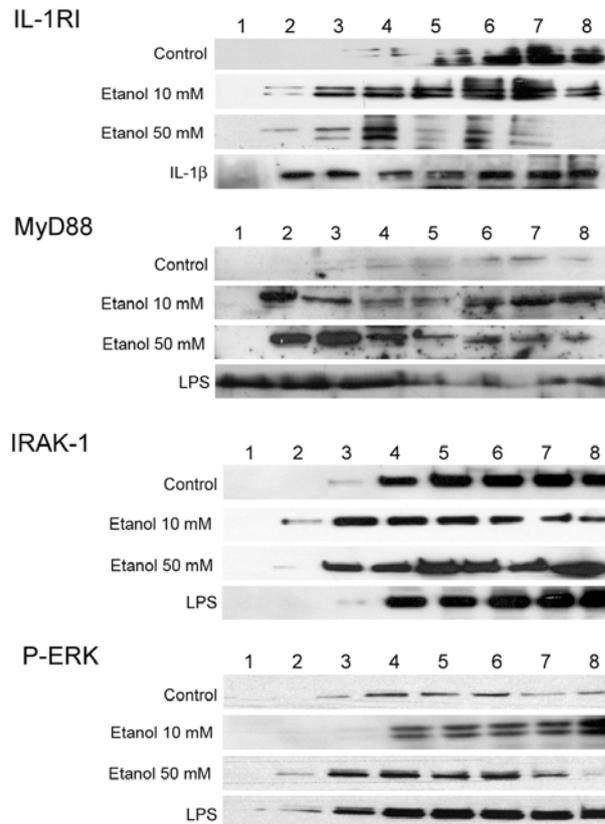
Con el objetivo de determinar si el etanol, al igual que el LPS, actúa a través de estos microdominios de membrana afectando a la dinámica de los receptores TLR4 e IL-1RI, las células RAW 264.7 fueron tratadas con LPS (50 ng/ml), IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/ml) o etanol (10 mM y 50 mM) durante 30 min. Posteriormente las células se lisaron con Tritón X-100 y los *lipid rafts* se aislaron mediante ultracentrifugación en gradiente de densidad. En las diferentes fracciones obtenidas se analizó tanto la presencia de los receptores TLR4 e IL-1RI como de diversas proteínas implicadas en la cascada de señalización del receptor TLR4.



**Figura 18. Localización de la subunidad B de la toxina colérica.** Se aislaron distintas fracciones de un gradiente de densidad del lisado de células RAW 264.7 no estimuladas o tratadas con LPS (50 ng/ml). La subunidad B de la toxina colérica se localizó en fracciones de baja densidad.

Para localizar las fracciones en las que se encuentran los *lipid rafts* se utilizaron tres marcadores. Inicialmente en células no estimuladas y tratadas con el LPS, se evaluaron las fracciones en las que se localizaba la subunidad B de la toxina colérica, ya que ésta se une específicamente al gangliósido GM1 de membrana que es un componente selectivo de los *lipid rafts*. Tras el aislamiento de los *lipid rafts*, tanto en situación control como en células estimuladas con LPS, se observa que se localiza principalmente en las fracciones 2 y 3 de baja densidad (Figura 18). Otro de los marcadores empleados es la flotilina-1, proteína que se expresa constitutivamente en





**Figura 19. Aislamiento de *lipid rafts* en macrófagos control y tratados con etanol, LPS o IL-1 $\beta$ .** Las células RAW 264.7 fueron tratadas durante 30 min con etanol 10 mM o 50 mM, LPS (50 ng/ml) o IL-1 $\beta$  (10  $\mu$ g/ml) de ratón. Las células se lisaron y se aislaron los *lipid rafts* mediante ultracentrifugación utilizando un gradiente de OptiPrep. Las fracciones desde la parte de baja densidad del gradiente se recogieron y se analizaron mediante inmunotransferencia para detectar la presencia de caveolina-1, flotilina-1, CD14, TLR4, IL-1RI, MyD88, IRAK-1 y P-ERK. Se muestra una inmunotransferencia representativa de un total de 3 experimentos.

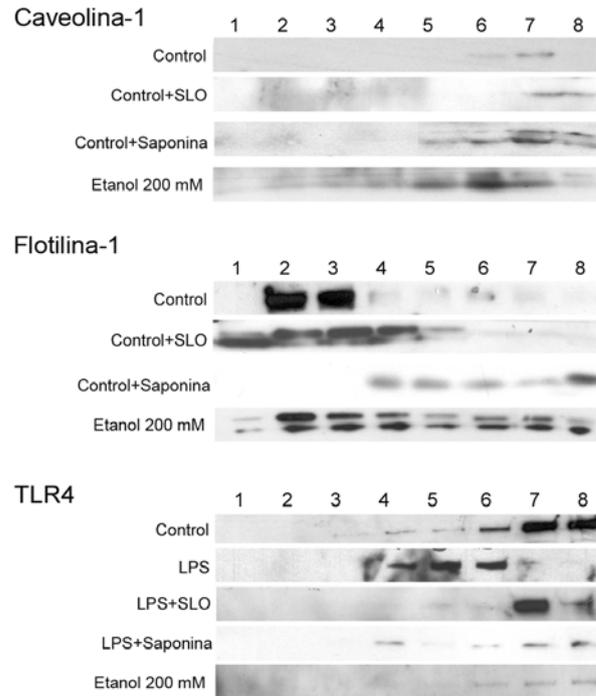
En células no estimuladas, los receptores TLR4 e IL-1RI, así como las proteínas asociadas a la vía de señalización de estos receptores que se han estudiado, se localizan en fracciones más densas (entre la 5 y la 8).

Cuando las células se estimulan con el LPS o con etanol, se produce un desplazamiento o translocación de los receptores TLR4 e IL-1RI desde fracciones más densas del gradiente a las fracciones con menor densidad ricas en flotilina-1. En estos gradientes también se observa un incremento en los niveles de los receptores TLR4 e IL-1RI. Así mismo, la proteína de membrana CD14, que actúa como co-receptor del TLR4 y que es una molécula residente de *lipid rafts* (Olsson and Sundler, 2006), se localiza en fracciones ricas en flotilina-1, incluso en células no estimuladas, pero tras el tratamiento se produce un incremento en sus niveles (Figura 19).

Nuestros resultados también demuestran que, tanto el etanol como el LPS inducen el reclutamiento de algunas de las proteínas asociadas a la vía de señalización de TLR4/IL-1RI (MyD88, IRAK y P-ERK) a fracciones ricas en flotilina-1 (*lipid rafts*-flotilina) observándose además un incremento en los niveles de MyD88 y P-ERK. Estos resultados sugieren que tanto el LPS o como el etanol inducen una agregación y reclutamiento de los receptores TLR4 e IL-1RI y de las proteínas asociadas a su señalización en los *lipid rafts* ricos en flotilina-1, induciendo una respuesta y la consiguiente activación de la vía de señalización.

Para analizar si los efectos inhibitorios de altas concentraciones de etanol sobre la señalización del receptor TLR4 son causadas por una disgregación de los *lipid rafts*, se compararon los efectos producidos por el tratamiento con etanol 200 mM con los inducidos por el tratamiento con estreptolisina-O o saponina. Estos dos compuestos actúan bloqueando el colesterol y formando poros en la membrana donde abunda esta proteína (Simons and Toomre, 2000). Como está descrito, el tratamiento de las células con estos agentes distorsionan los microdominios *lipid rafts*, como se refleja en la detección de los marcadores de *rafts*, flotilina-1 y caveolina-1. Como se muestra en la Figura 20, el etanol a altas concentraciones también produce esta distorsión y evita la translocación del TLR4 a

dominios ricos en flotilina-1. Estos resultados sugieren que altas concentraciones de etanol actúan de forma similar a los agentes que distorsionan los *lipid rafts* impidiendo la translocación del TLR4 a estos microdominios y causando un bloqueo de su señalización.



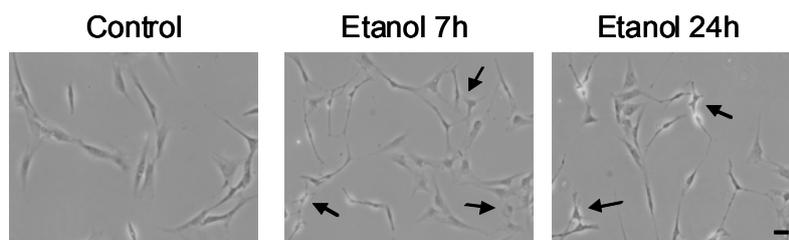
**Figura 20. Distorsión de los *lipid rafts* en células RAW 264.7.** Los macrófagos fueron tratados con etanol (200 mM) o con LPS (50 ng/ml) durante 30 min y se aislaron los *lipid rafts* mediante un gradiente de densidad. Para los experimentos con saponina, ésta se añadió al tampón de lisis para obtener una concentración de 1%. Cuando se utiliza estreptolisina-O (SLO) las células se incubaron 2 h antes del tratamiento y durante éste. Se muestra una inmunotransferencia representativa de un total de 3 experimentos.

## **4.2. EL ETANOL GENERA UN PROCESO INFLAMATORIO EN CÉLULAS MICROGLIALES DE RATA**

La microglía es el principal tipo de célula efectora del sistema inmunitario en el cerebro. Su activación se ha relacionado con procesos de neuroinflamación asociados con diversas patologías. El consumo de alcohol causa daño cerebral, aunque se desconoce el mecanismo por el que causa este proceso inflamatorio. Datos previos de nuestro laboratorio sugieren que el etanol provoca un daño inflamatorio en cerebro aumentando el nivel de citocinas y de mediadores inflamatorios y activando la vía de señalización asociada a los receptores IL-1RI /TLR4 (Blanco et al., 2004; Blanco et al., 2005). Por este motivo, tras estudiar el efecto del etanol en la línea celular de macrófagos RAW 264.7, nos planteamos el estudio de los efectos que provocan dosis agudas de etanol en células microgliales y analizar su participación en estos procesos de neuroinflamación.

### **4.2.1. El etanol provoca cambios en la morfología de células microgliales**

La microglía se activa en respuesta a diversos estímulos y, como ocurre en el caso de los macrófagos, provoca un cambio morfológico característico de las funciones que ejerce. En el cerebro adulto la microglía tiene un soma pequeño, una zona perinuclear citoplasmática reducida y unas finas ramificaciones (Ransohoff and Perry, 2009). Para investigar si el etanol es capaz de provocar los cambios morfológicos asociados a su activación, las células se trataron con etanol 50 mM durante 7 y 24 h. La Figura 21 muestra como el etanol induce un estado activado en células microgliales, ya que se produce un alargamiento del cuerpo celular, y pérdida de algunas de las elongaciones radiales. Por otra parte, se detectó la presencia de una población con morfología ameboide, causada por la retracción los filopodios hacia el cuerpo celular (Block et al., 2007; Napoli and Neumann, 2009) característica de una actividad fagocítica.



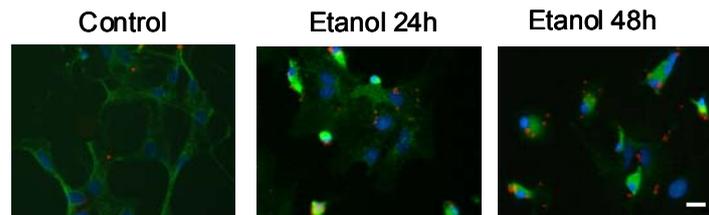
**Figura 21. Cambios morfológicos de la microglía inducidos por el etanol.** Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM durante 7 y 24 h. Se observaron cambios en su morfología mediante contraste de fases, lo que se relaciona con una posible activación de estas células. La barra de escala corresponde a 20  $\mu\text{m}$ . Se muestra una micrografía característica de 5 experimentos diferentes.

Para evaluar si estos cambios estaban relacionados con un incremento en la proliferación, se midió la incorporación de BrdU en las células tratadas con etanol 50 mM durante 12, 24 y 48 h. Este experimento se realizó en ausencia de suero siguiendo el mismo protocolo que el resto de los experimentos realizados en este trabajo. Como se muestra en la Tabla IV, no se observan diferencias significativas entre las células tratadas y no tratadas con etanol. Además, el porcentaje de incorporación de BrdU fue muy bajo (<0,05%) lo que indica que, en ausencia de suero, los cambios morfológicos inducidos por el tratamiento con etanol no son debidos a un aumento en la proliferación celular.

**Tabla IV. Medida de la proliferación de la microglía.** La proliferación de estas células se determinó mediante la incorporación de BrdU. Los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

Tratamiento	Control	Et 12 h	Et 24 h	Et 48 h
% población BrdU positiva	0,21 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,05

Para determinar la capacidad fagocítica de la microglía tratada con etanol, las células se incubaron durante 30 min con bolas de latex fluorescentes. La Figura 22 muestra cómo las células, que fueron previamente tratadas con etanol, son capaces de engullir un mayor número de bolas fluorescentes, lo que puede relacionarse con una mayor capacidad fagocítica.



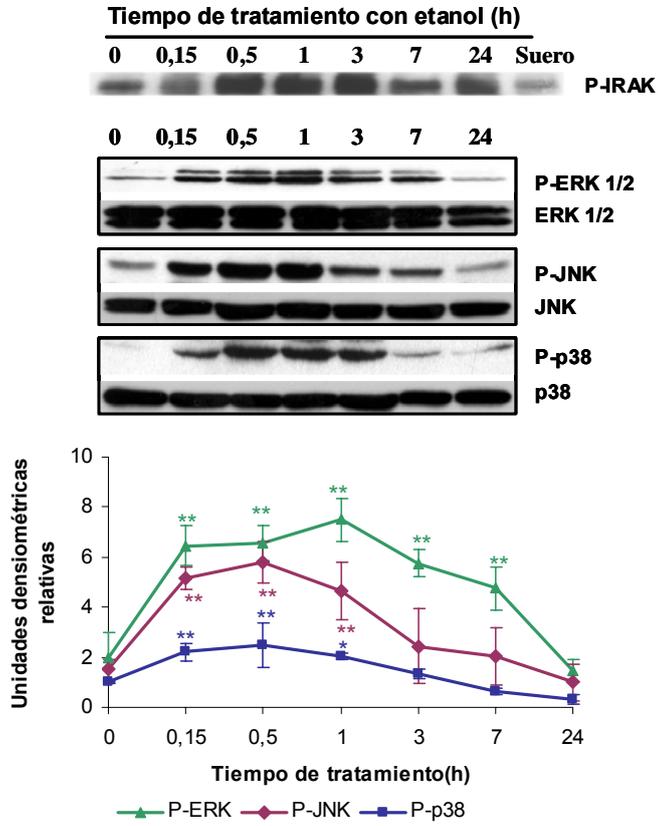
**Figura 22. El etanol aumenta la actividad fagocítica de la microglía.** Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM durante 24 y 48 h. Este tratamiento aumentó la fagocitosis de bolas de latex fluorescentes a las que estaban expuestas. La barra de la escala corresponde a 20  $\mu$ m. Se muestra una micrografía representativa de 5 experimentos diferentes.

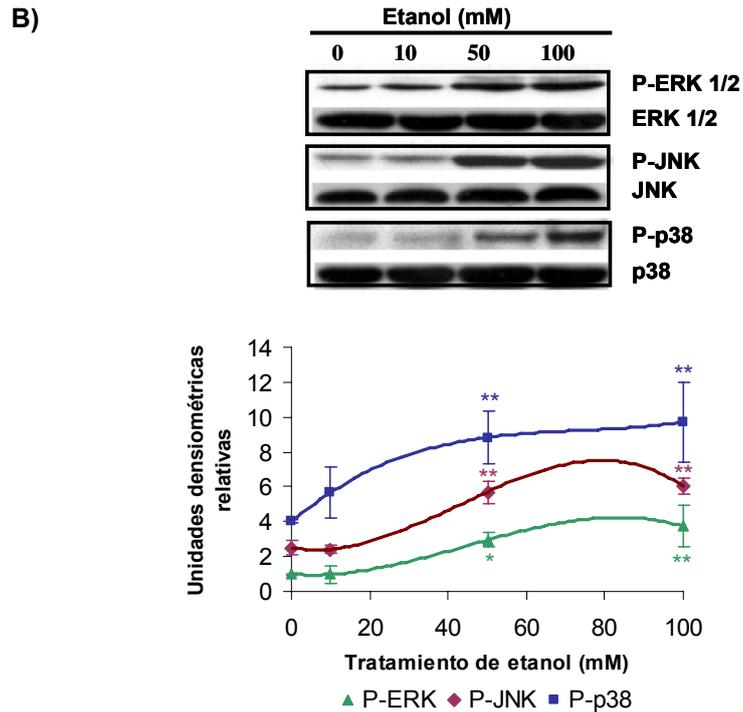
#### **4.2.2. El etanol activa la vía asociada al TLR4 en la microglía: vía de las MAPK y de NF-KB**

Se ha descrito que la activación del receptor TLR4 incrementa la fosforilación de IRAK-1 y de las MAPK (Akira, 2003). Para determinar si el etanol es capaz de activar la vía de señalización asociada al receptor TLR4, analizamos la fosforilación de IRAK-1, ERK1/2, p38 y JNK en células tratadas con etanol 50 mM durante distintos tiempos. Para determinar P-IRAK-1 se procedió a realizar una inmunoprecipitación de IRAK-1 y la posterior detección de P-IRAK-1 (fosforilación en la Ser 376) por inmunotransferencia. Como se observa en la Figura 23.A, la fosforilación de esta proteína se produce rápidamente; tras un tratamiento de 10 min, ya se

detecta un incremento significativo respecto al control, aunque el máximo se observa a las 3 h.

A)





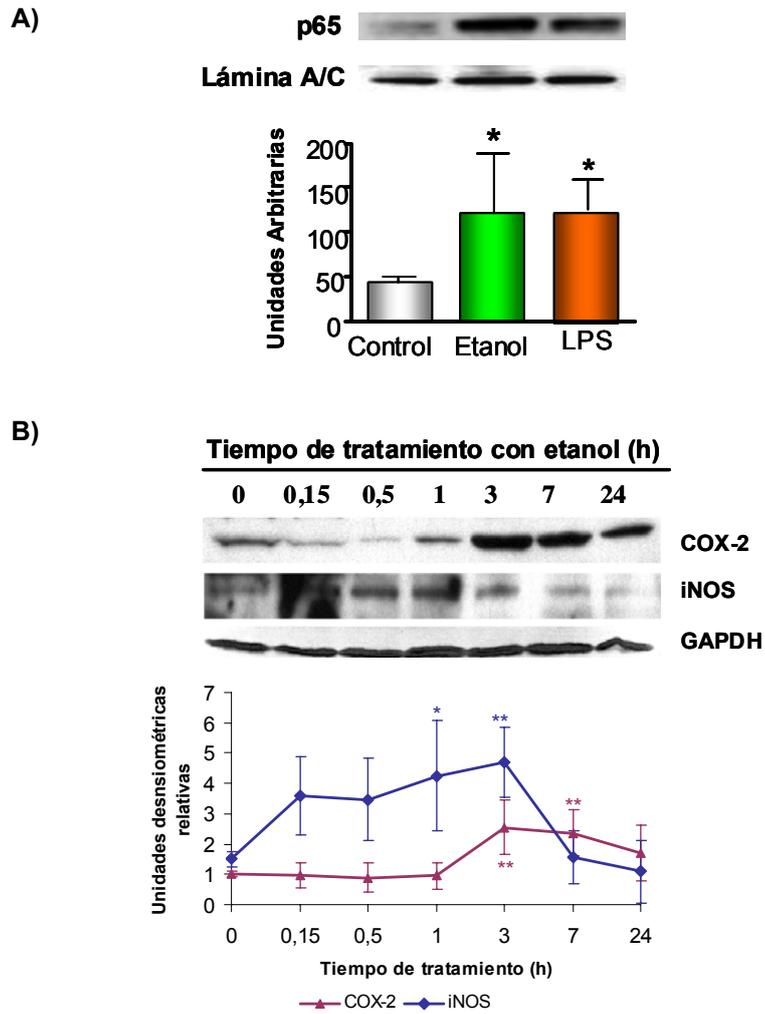
**Figura 23. El etanol activa a las MAPK.** Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM durante distintos tiempos (A) o con distintas dosis durante 30 min (B). Se analizaron los niveles de P-IRAK-1, P-ERK1/2, P-p38 y P-JNK por inmunotransferencia y las mismas membranas se reincubaron para detectar ERK1/2, p38 y JNK. Se representan los valores de la media  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparando con el valor control con el test ANOVA de una vía. Se muestra una inmunotransferencia representativa de 7 experimentos independientes.

La fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK se produce también de forma rápida, a partir de 10 min ya se detecta un aumento en las formas fosforiladas, aunque el máximo ocurre entre los 30 y 60 min de tratamiento, disminuyendo sus niveles a continuación. Por otro lado, cuando las células se trataron con distintas dosis de etanol, se observa que dosis bajas de etanol, 10 mM, no son capaces de causar la fosforilación de las MAPK y que dosis de 50 mM y 100 mM producen los mismos efectos (Figura 23.B).

Si comparamos estos datos con los obtenidos en las células RAW 264.7, parece que los macrófagos son más sensibles a los efectos del etanol que las células microgliales.

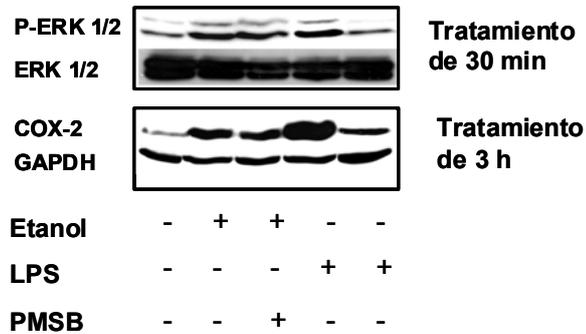
La activación del receptor TLR4 induce una estimulación rápida del factor de transcripción NF- $\kappa$ B lo que provoca la expresión de factores proinflamatorios como son iNOS, COX2 y citocinas (Akira, 2003; Grunblatt et al., 2000; Park et al., 2007). Para estudiar esta activación, como en el caso de las células RAW 264.7, se analizó la presencia de la subunidad p65 en el núcleo, mediante un fraccionamiento subcelular y posterior inmunotransferencia. Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM o con LPS 50 ng/ml como control positivo durante 30 min. La Figura 24.A muestra que el tratamiento de ambos compuestos induce un aumento de los niveles de p65 en el núcleo. Adicionalmente (Figura 24.B) se detecta un aumento en la expresión de iNOS a las 1 y 3 h del tratamiento, disminuyendo a partir de 7 h. La expresión de COX2 también aumenta a las 3 y 7 h, manteniendo unos niveles altos tras 24 h de tratamiento con etanol.

Estos resultados indican que el etanol es capaz de provocar una respuesta rápida en la microglía, activando la vía de señalización asociada al receptor TLR4, tal y como demuestra la fosforilación de IRAK-1 y MAPK, la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B y posterior aumento en los niveles de iNOS y COX2.



**Figura 24. El etanol activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B.** Las células microgliales fueron tratadas con el LPS (50 ng/ml) o con etanol 50 mM. La presencia en el núcleo de p65 se detectó tras un tratamiento de 30 min (A) y la expresión de COX-2 e iNOS a distintos tiempos (B). Las membranas se reincubaron para detectar la proteína lámina A/C o GAPDH como controles de carga. Los valores de la cuantificación se representan como media  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  comparando con el valor control con el test ANOVA de una vía. Se muestra una inmunotransferencia representativa de 7 experimentos independientes.

Para comprobar que la activación de la vía de señalización asociada al TLR4 es debida a un efecto directo del etanol y no a la presencia de una contaminación por LPS, se utilizó un antagonista del LPS, el sulfato de polimixina B (PMBS). Las células microgliales sin tratar o previamente incubadas 15 min con PMSB 10 µg/ml, se estimularon con 50 mM de etanol o 50 ng/ml de LPS y se evaluaron los niveles de P-ERK1/2 y de COX-2. La Figura 25 muestra que, mientras el PMSB evita los efectos del LPS tanto en la fosforilación de ERK1/2 como en los niveles de COX-2, prácticamente no afecta a la activación que produce el tratamiento con etanol. Estos resultados confirman que es el etanol el agente responsable de los efectos observados en la vía de señalización del TLR4 y no son debidos a una posible contaminación por endotoxina.

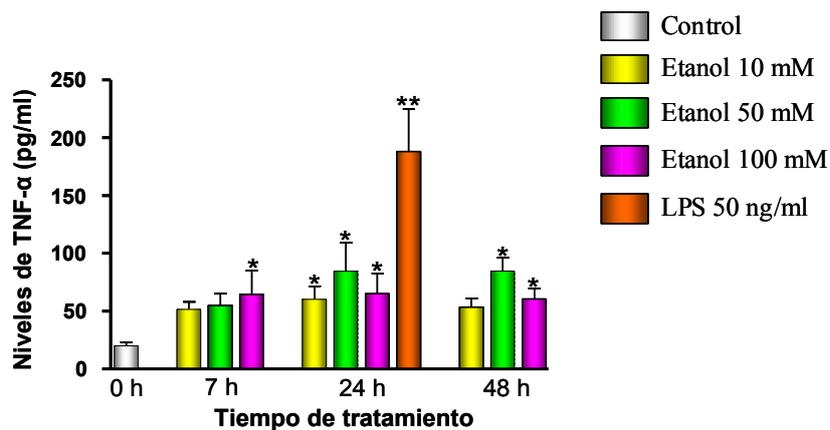


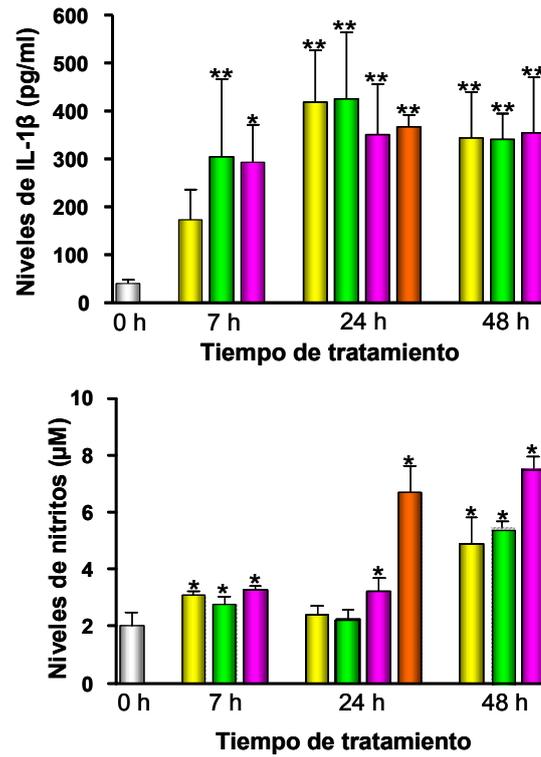
**Figura 25. El etanol, y no una posible contaminación por LPS, activa a la vía de señalización del receptor TLR4.** Las células microgliales fueron tratadas con LPS (50 ng/ml) o con etanol 50 mM y, en los casos señalados se realizó una pre-incubación de 15 min con PMBS (10 µg/ml). El nivel de P-ERK1/2 se evaluó tras 30 min de tratamiento, y el de COX-2, tras 3 h de tratamiento. Se muestra una inmunotransferencia representativa de 3 experimentos independientes.

#### 4.2.3. El etanol induce la producción de citocinas en células microgliales

Una de las consecuencias de la activación de la microglía es la secreción de citocinas pro-inflamatorias. Por este motivo, se estudió la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y NO en el medio de células microgliales tratadas con etanol a distintas concentraciones (10, 50 y 100 mM) durante 7, 24 y 48 h. Como control positivo se utilizó el LPS para estimular estas células. En la Figura 26 se observa cómo el etanol a 10, 50 y 100 mM es capaz de estimular la liberación del TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y NO tras 7 h de tratamiento, aunque el mayor efecto lo observamos con 24 h de tratamiento. A este tiempo, la producción de IL-1 $\beta$  en células tratadas con etanol alcanza unos niveles similares a los que se obtienen en células tratadas con LPS.

Un dato a resaltar es el hecho de que el etanol, tanto a bajas como a altas concentraciones, es capaz de activar a la microglía liberando citocinas al medio, lo que contrasta con los datos obtenidos en las células RAW 264.7, sugiriendo una diferente sensibilidad a los efectos del etanol.





**Figura 26. El etanol estimula la secreción de citocinas pro-inflamatorias y de NO.** La microglía se trató con LPS (50 ng/ml) o con etanol a distintas concentraciones. Se midió el nivel de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  mediante ELISA y los niveles de nitritos mediante la reacción de Griess. Los resultados presentan como media  $\pm$  S.E.M., siendo n=5-6. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 comparando con el valor control con el test ANOVA de una vía.

### 4.3. LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA PROVOCA LA MUERTE DE LAS NEURONAS CORTICALES

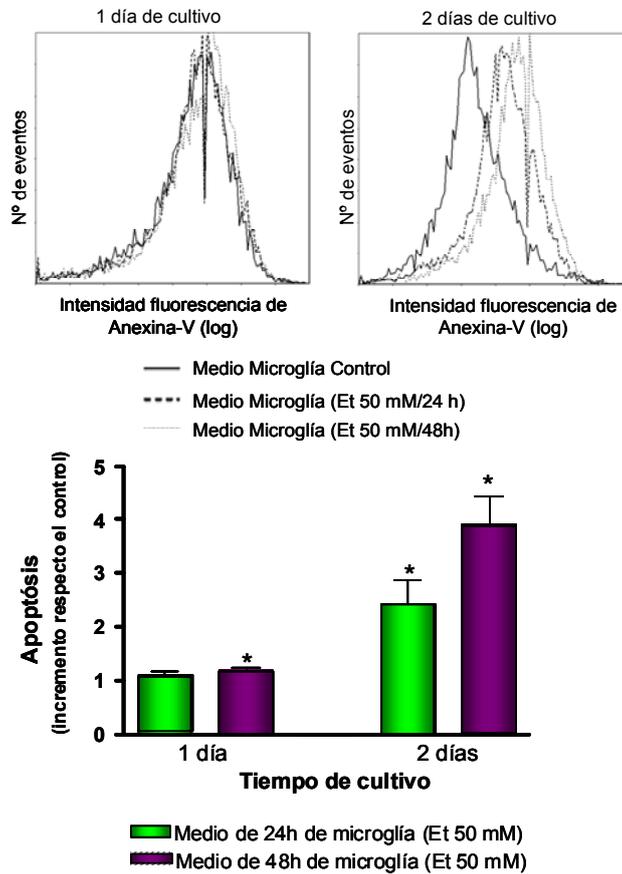
La activación de la microglía puede ejercer un efecto protector en las neuronas, sin embargo en los procesos inflamatorios, una activación prolongada puede causar daño neuronal, tal y como se ha descrito en ciertas enfermedades neurodegenerativas (Bjorkqvist et al., 2008; Lopes et al., 2008).

Por este motivo, nos planteamos si la microglía activada por etanol es capaz de inducir la muerte de neuronas a través de la secreción de citocinas u otros mediadores inflamatorios. Para ello, las células de microglía se estimularon con etanol 50 mM durante 24 h y 48 h, tiempos que habíamos observado una mayor secreción citocinas al medio de cultivo (Figura 26). El medio condicionado de la microglía tratada o no con etanol durante 24 o 48 horas se recogió y se congeló, hasta su utilización. Tras su descongelación se determinó la cantidad de etanol que se mantenía en los medios. Esta fue de  $4,8 \pm 1,1$  mM (medio de 24 h) y  $2,5 \pm 0,7$  mM (medio de 48 h). Los medios condicionados de microglía se añadieron a neuronas corticales en cultivo primario al día 5 *in vitro*, y el medio se mantuvo durante 1 día o 2 días. Se analizó el porcentaje de células apoptóticas utilizando anexina-V y citometría de flujo.

Para evaluar si el etanol que contenía el medio podía inducir muerte neuronal, algunas neuronas se incubaron con medio condicionado de microglía sin tratar (control), al que se añadió etanol para obtener una concentración final de 2,5 y 4,8 mM. Las neuronas se mantuvieron durante 24 y 48 horas. A estas concentraciones de etanol no se puede detectar un aumento de apoptosis neuronal.

Sin embargo, cuando las neuronas se incuban con medio condicionado de microglía tratada con etanol, se observa un aumento en la apoptosis (células Anexina V positivas) de las neuronas corticales tras la incubación durante 2 días con el medio de microglía tratada con etanol

durante 24 h y 48 h. (Figura 27). Estos resultados indican que la activación de la microglía por el etanol es capaz de producir mediadores inflamatorios que inducen apoptosis de neuronas, lo que podría implicar a las células microgliales en la muerte de neuronas observada en alcohólicos (Harper, 2009; Harper and Matsumoto, 2005).

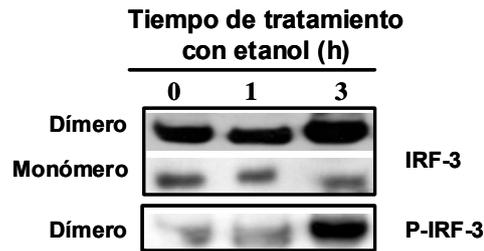


**Figura 27. La activación de la microglía por el etanol causa muerte neuronal.** Neuronas corticales fueron incubadas con medio condicionado de microglía tratada con etanol y se determinó la apoptosis por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media  $\pm$  S.E.M., siendo  $n=6$ . \*  $p < 0.05$  comparando con el valor control con el test ANOVA de una vía.

#### 4.4. EL ETANOL ACTIVA LA VÍA MYD88-INDEPENDIENTE ASOCIADA AL RECEPTOR TLR4 EN CÉLULAS MICROGLIALES

La activación del receptor TLR4 inicia una cascada de señalización en la que intervienen distintas proteínas adaptadoras. La participación de MyD88 y MAL/TIRAP (*MyD88-adaptor-like/TIR-associated proteins*) se asocia con la activación de la ruta de las MAPK y de NFκB. Sin embargo, para los receptores TLR3 y TLR4 se ha descrito una vía adicional en la que participan las proteínas adaptadoras TRIF (*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β*) y TRAM (*Toll-receptor-associated molecule*) (O'Neill and Bowie, 2007; Takeda et al., 2003). Esta vía, llamada vía MyD88-independiente, provoca la activación del factor de transcripción IRF-3 (*interferon regulatory factor*) y la expresión de varios genes inducibles por interferón (Toshchakov et al., 2002).

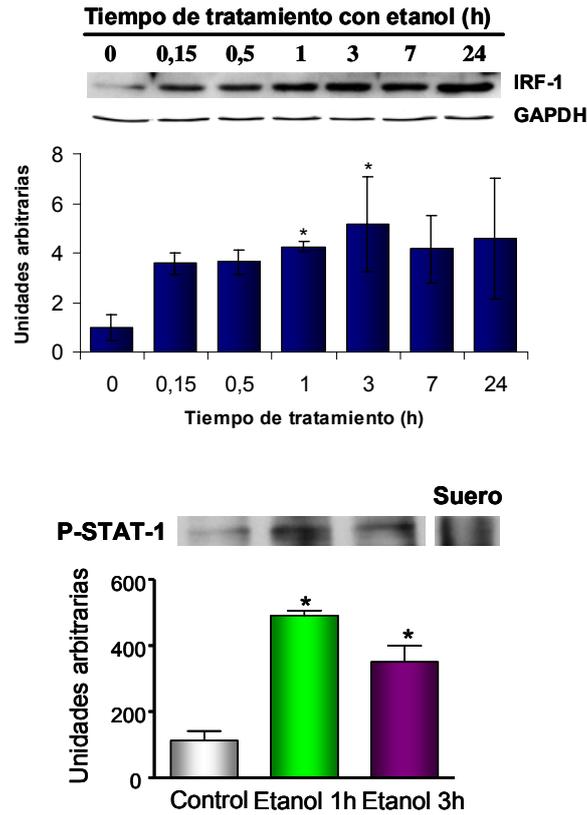
Para estudiar la posibilidad de que el etanol active esta vía de señalización, se analizó, mediante geles de poliacrilamida nativos, la formación del dímero de IRF-3 que provoca su fosforilación en el C-terminal y su activación (Servant et al., 2001). La Figura 28 muestra un aumento en la formación del dímero de IRF-3 y de su forma fosforilada tras el tratamiento con etanol 50 mM durante 3 h. El etanol parece activar la vía MyD88- independiente a tiempos más largos que la vía clásica.



**Figura 28. El etanol activa al factor de transcripción IRF-3.** Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM durante 1 y 3 h y se obtuvieron los extractos celulares. Los niveles del dímero de IRF-3 y de su forma fosforilada se analizaron mediante electroforesis utilizando un gel en condiciones nativas seguido de inmunotransferencia. Se muestra un resultado representativo de 5 experimentos independientes.

Puesto que la activación de IRF-3 genera interferón  $\beta$  y éste es capaz de activar otros factores de transcripción, tales como IRF-1 y STAT-1, se analizó la activación de estas proteínas (Jung et al., 2005). La Figura 29 muestra un aumento en los niveles de IRF-1 tras el tratamiento con etanol 50 mM a 1 y a 3 h. Por otro lado, también se observó el aumento en la fosforilación de STAT-1 a estos mismos tiempos, hecho que se relaciona con la activación de este factor de transcripción.

En conjunto, estos resultados sugieren que el etanol es capaz de activar la vía MyD88 independiente a través de IRF-3 y, de esta forma, podría iniciar la vía de señalización de STAT-1/IRF-1.



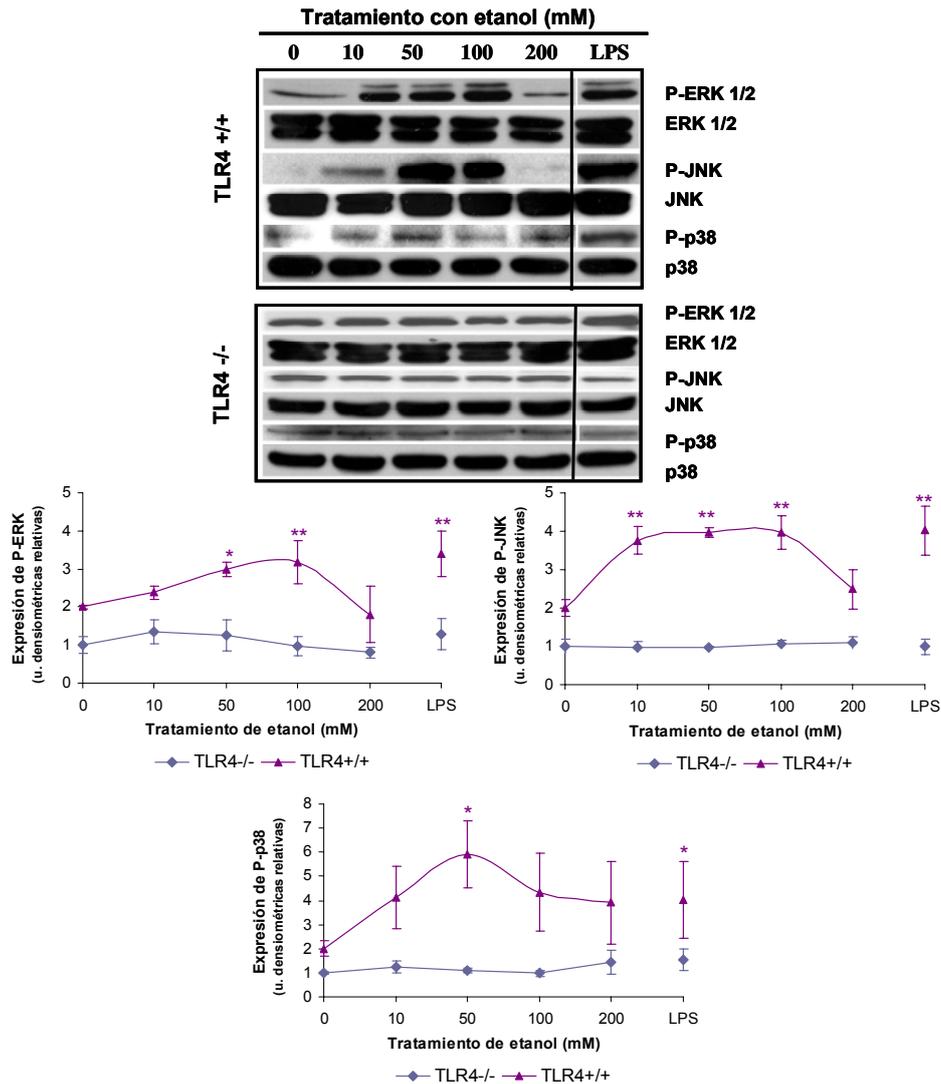
**Figura 29. El etanol induce la activación de STAT-1/IRF-1.** Las células microgliales fueron tratadas con etanol 50 mM durante distintos tiempos y se obtuvieron los extractos celulares. Los cambios en el nivel de IRF-1 en función del tiempo se muestran en el panel de superior. El nivel de P-STAT-1 (panel inferior) se analizó tras una inmunoprecipitación con STAT-1 y posterior detección de serinas fosforiladas por inmunotransferencia. Como control de carga se valoró la presencia de GAPDH en los lisados celulares. Se muestra una inmunotransferencia representativa de un total de 7 experimentos independientes. Los resultados de la cuantificación reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

#### **4.5. PAPEL DEL TLR4 EN LA ACTIVACIÓN DE LA MICROGLÍA PRODUCIDA POR EL ETANOL**

Los resultados obtenidos hasta el momento indicaban que el etanol actúa activando la vía de señalización del receptor TLR4, generando la producción de citocinas y mediadores inflamatorios. Además, nuestros resultados con células RAW 264.7, como ya se ha presentado en apartados anteriores, demostraban que el bloqueo del receptor TLR4 disminuía la activación que producía el etanol en COX-2 y en la secreción de TNF- $\alpha$  (Figuras 16 y 17.C). Por tanto, para dilucidar la posible implicación del TLR4 en estos efectos, se utilizaron ratones deficientes en la función del receptor TLR4 mediante la eliminación de una parte del gen que codifica para los dominios transmembrana y citoplasmático. Para confirmar la implicación de este receptor en la activación de la microglía, se han utilizado cultivos primarios de microglía de ratones deficientes en el receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) y microglía de ratones con el TLR4 funcional (TLR4<sup>+/+</sup>).

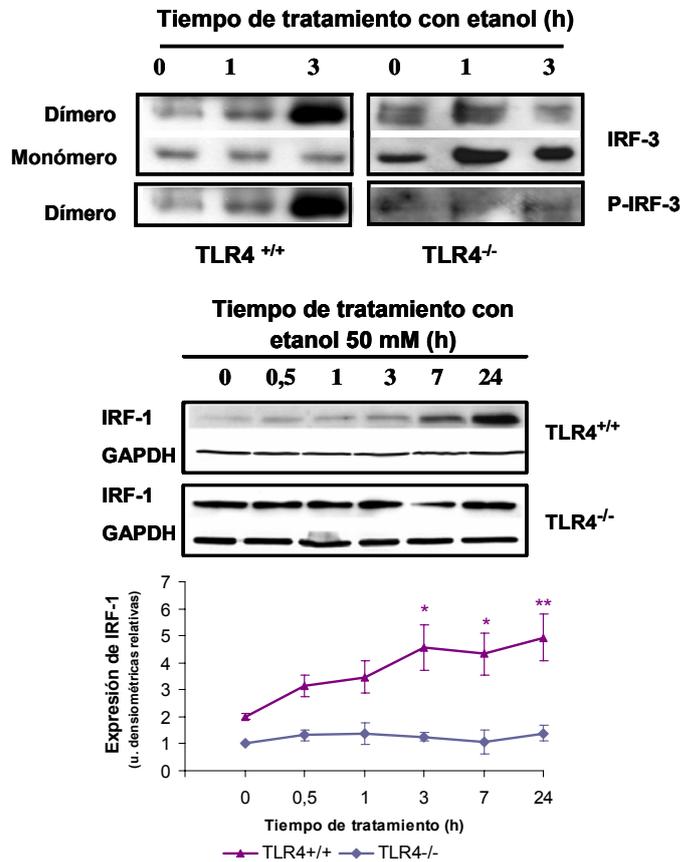
##### **4.5.1. El etanol activa la vía MyD88-dependiente e independiente a través del TLR4**

Con el objetivo de estudiar el papel del receptor TLR4 en la activación de las MAPK, los cultivos primarios de microglía procedentes de los dos tipos de ratones, se estimularon con etanol y se analizó la fosforilación de las MAPK. Como control del experimento se utilizó el tratamiento con LPS. En la Figura 30 se observa cómo el tratamiento con distintas dosis de etanol durante 30 min aumenta el nivel de fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK en la microglía de ratones TLR4<sup>+/+</sup>, como ocurría en el caso de las células procedentes de rata. Sin embargo, cuando el receptor TLR4 no es funcional no se observa un aumento en la fosforilación de estas quinasas ni con el tratamiento con etanol (10, 50, 100 y 200 mM), ni con el tratamiento con el LPS 50 ng/ml. Estos resultados apoyan la idea de que el etanol actúa a través del TLR4 en la activación de las células microgliales.



**Figura 30. El etanol activa a las MAPK a través del receptor TLR4.** Las células de microglía fueron tratadas con distintas dosis de etanol durante 30 min o con LPS (50 ng/ml) y se analizó la fosforilación de ERK1/2, p38 y JNK y el nivel de las formas sin fosforilar de estas quinasas por inmunotransferencia. Se muestra en cada caso uno de los resultados representativos de un total de 7 experimentos independientes (microglía TLR4<sup>+/+</sup> parte superior y TLR4<sup>-/-</sup> parte inferior). Los resultados de la cuantificación reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\*  $p < 0.05$  y \*\*  $p < 0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

A continuación, para evaluar el papel del receptor TLR4 en la activación por el etanol de la vía MyD88-independiente, se analizó la activación de IRF-3 y de IRF-1 en microglía procedente de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>.

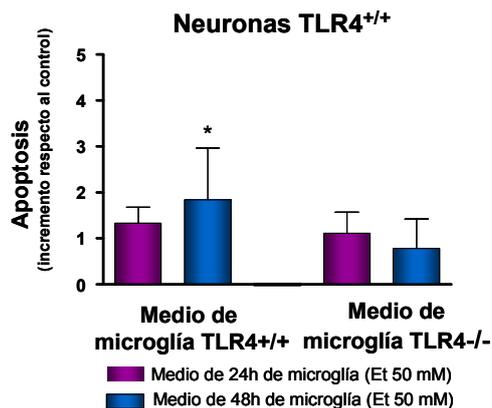


**Figura 31. El etanol activa la ruta MyD88-independiente asociada al receptor TLR4.** Las células microgliales procedentes de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> fueron tratadas con etanol 50 mM durante distintos tiempos. La formación del dímero de IRF-3 y su fosforilación se analizaron utilizando un gel nativo y la cantidad de IRF-1 se evaluó por inmunotransferencia. Se muestra uno de los resultados representativos de un total de 7 experimentos independientes. Los resultados de la cuantificación reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

La Figura 31 muestra que en las células de microglía procedente de ratones TLR4<sup>+/+</sup> se produce un aumento en la formación del dímero de IRF-3 y en su fosforilación tras el tratamiento con etanol 50 mM durante 3 h, así como un aumento en los niveles de IRF-1. Por el contrario, en células procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup> no se observan cambios. Estos resultados demuestran que la activación producida por el etanol de la vía MyD88-dependiente e independiente está mediada por el receptor TLR4.

#### **4.5.2. El receptor TLR4 está implicado en el daño neuronal producido por la microglía activada por etanol**

Para estudiar la relación entre la función del receptor TLR4 y la neurotoxicidad asociada con la activación de la microglía por etanol, se estimularon cultivos de microglía de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> con etanol 50 mM durante 24 y 48 h. A continuación, se recogió este medio, se añadió a un cultivo de neuronas de ratón durante 1 día y la apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 32, el medio de microglia procedente de ratones TLR4<sup>+/+</sup> activada con etanol 50 mM durante 48 h provoca un aumento en la apoptosis de las neuronas corticales. Estos cambios en la supervivencia de las neuronas no se observan cuando el medio condicionado procede de un cultivo de células deficientes en este receptor, lo que apoya la idea de la implicación del receptor TLR4 en la muerte neuronal producida por la microglía activada por etanol.

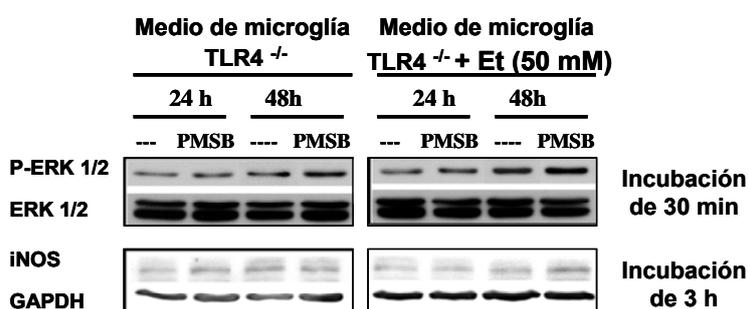


**Figura 32. La microglía tratada con etanol induce apoptosis de neuronas corticales a través del receptor TLR4.** Neuronas corticales fueron incubadas durante 1 día con medio condicionado de microglía tratada con etanol de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>. La población apoptótica se determinó por citometría de flujo. Los resultados muestran la media de 7 experimentos diferentes  $\pm$  S.E.M. (\*  $p < 0.05$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

#### 4.5.3. El etanol no induce la formación de ligandos endógenos en la microglía

La microglía puede ser activada por diversos ligandos endógenos de los receptores TLR (Gurley et al., 2008; Pais et al., 2008; Pineau and Lacroix, 2009). Para evaluar si el etanol inducía la secreción de algún ligando endógeno del TLR4 capaz de activar a estos receptores, se obtuvo el medio de células microgliales de ratones TLR4<sup>-/-</sup> cultivados en ausencia o en presencia de etanol durante 24 y 48 h y se mantuvo congelado. Estos medios se añadieron a microglía procedentes de ratones TLR4<sup>+/+</sup> de tal forma que si el etanol estimula la liberación de ligandos endógenos, al añadir el medio sobre estas células, se podrían activar. El experimento se realizó en presencia y en ausencia de PMSB para poder descartar la posible estimulación debido a la presencia de endotoxinas. Para analizar la posible activación del TLR4 se midió la fosforilación de ERK1/2 después de dejar el medio 30 min y la expresión de iNOS tras 3 h.

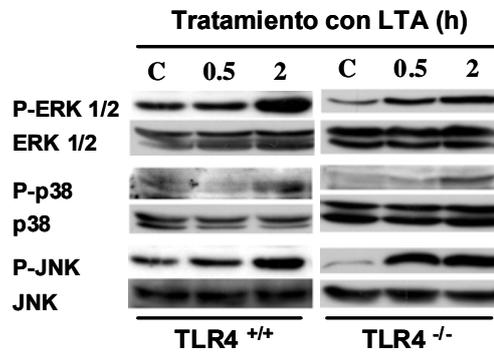
En la Figura 33 observamos que no se detecta ningún cambio significativo, ni en la fosforilación de ERK1/2, ni en los niveles de iNOS, cuando se comparan los datos obtenidos con la incubación del medio de células sin tratar con el medio de células tratadas con etanol. Esta figura también muestra que no existen cambios en la expresión de estas proteínas en presencia o ausencia de PMSB, lo que descarta la contaminación por endotoxinas en el medio. Estos resultados sugieren que el etanol no es capaz de inducir la secreción de ligandos endógenos que puedan estar activando a la microglía.



**Figura 33. El tratamiento con etanol no induce la secreción de ligandos endógenos en la microglía.** Se incubaron células de cultivo primario de microglía TLR4<sup>+/+</sup> con medio procedente de cultivo de microglía TLR4<sup>-/-</sup> tratado o no con etanol 50 mM en presencia y en ausencia de PMSB (10 µg/ml) durante 24 y 48 h. Se analizó la activación de estas células midiendo la fosforilación de ERK1/2 y la expresión de iNOS por inmunotransferencia. Se presenta un resultado representativo de 3 experimentos diferentes.

Para comprobar si los ratones TLR4<sup>-/-</sup> respondían a otros ligandos de los receptores tipo Toll, cultivos primarios de microglía TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se trataron con LTA, ligando del receptor TLR2 y se determinó la fosforilación de las MAPK. Se observa una activación de estas proteínas independientemente de la funcionalidad del receptor TLR4, demostrando la funcionalidad del TLR2 en ambas cepas de ratones. Por tanto, aunque los

animales  $TLR4^{-/-}$  no responde a sus ligandos, otros TLRs si son funcionales, como demostramos con el receptor TLR2 (Figura 34).

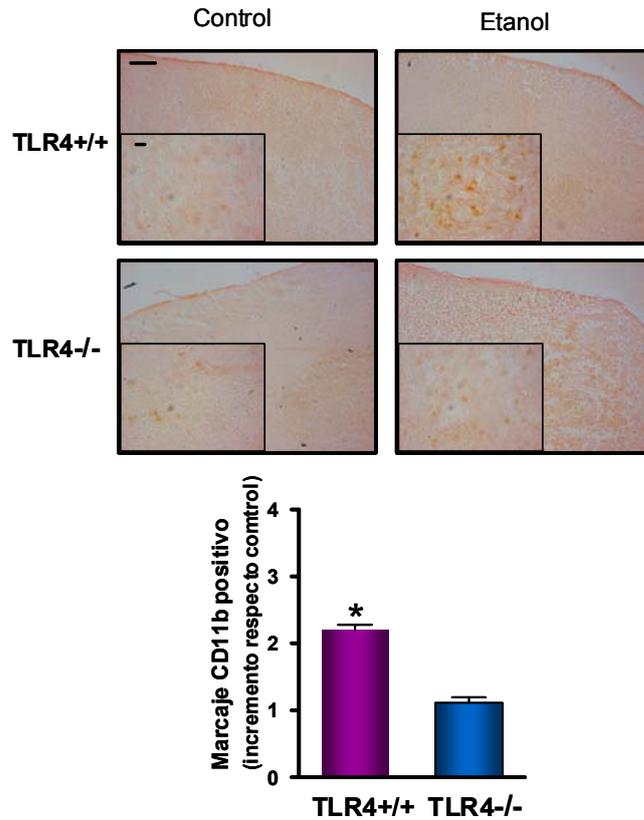


**Figura 34.** El tratamiento con LTA estimula a células microgliales  $TLR4^{+/+}$  y  $TLR4^{-/-}$ . Las células de microglía  $TLR4^{+/+}$  y  $TLR4^{-/-}$  se trataron con LTA (1mg/ml) durante 30 min y 2 h. Se analizó la activación de estas células midiendo la fosforilación de MAPK inmunotransferencia. Se presenta un resultado representativo de 3 experimentos diferentes.

#### 4.6. EFECTOS DEL TRATAMIENTO DEL ETANOL *IN VIVO* SOBRE LAS CÉLULAS MICROGLIALES

Hasta este momento se ha demostrado que el tratamiento de etanol *in vitro* estimula la cascada de señalización asociada al receptor TLR4, activando las MAPK (Figura 23 y 30), NFκB (Figura 24) y también es capaz de activar la vía MyD88-independiente (Figura 28, 29 y 31). Esta activación de la microglía podría ser la responsable de causar la muerte de neuronas de la corteza cerebral que se observa tras un consumo prolongado de alcohol (Figura 27 y 32).

Con el objetivo de analizar si el etanol *in vivo* es capaz de activar a la microglía a través del receptor TLR4, se inyectaron 3 dosis intraperitoneales de etanol (4g/kg) a ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> en días consecutivos. Al grupo control se le suministró suero salino por la misma vía. La activación de la microglía se analizó en secciones cerebrales utilizando técnicas de inmunohistoquímica para detectar la expresión de CD11b. Esta molécula se utiliza como marcador de microglía activada ya que su expresión es mayor en las células activadas y fagocíticas (Sugama et al., 2007). La Figura 35 muestra unas micrografías representativas de los resultados obtenidos en las secciones de cerebro de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>. La administración de etanol produce un aumento en la inmunoreactividad del CD11b en los ratones TLR4<sup>+/+</sup> mientras que este incremento no se aprecia cuando el etanol se administra a los ratones TLR4<sup>-/-</sup>. El análisis estadístico revela un aumento significativo en el marcaje de CD11b (% de área marcada positivamente respecto al área total) en los ratones TLR4<sup>+/+</sup> tratados con etanol cuando se compara con los ratones del grupo control.



**Figura 35. El tratamiento con etanol *in vivo* activa la microglía.** Los ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se trataron con tres dosis de etanol 4 (g/kg) y se analizó la expresión de CD11b mediante inmunohistoquímica. Se muestra una micrografía representativa de los resultados obtenidos. Se analizaron 4 ratones de cada grupo y 4 secciones de cada cerebro. Para el análisis estadístico se tomaron 10 campos por sección, presentando los resultados como la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía). Las barras de escala corresponden a 150  $\mu$ m y, en las ampliaciones, a 20  $\mu$ m.

#### **4.7. EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA ACETILACIÓN DE HISTONAS: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4.**

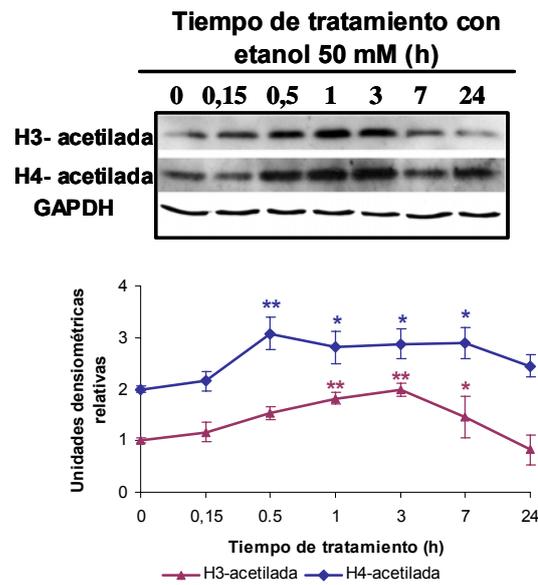
La transcripción génica se regula por múltiples factores. Uno de ellos es la modificación covalente de las histonas. Las histonas son unas proteínas pequeñas altamente conservadas muy básicas que se unen al DNA para empaquetarlo formando parte de la cromatina. Las histonas H3 y H4 tienen largas colas N-terminales hacia el exterior del nucleosoma que son susceptibles de ser modificadas covalentemente. Estas modificaciones influyen en la expresión génica, cambian la arquitectura local de la cromatina y podrían también reclutar otras proteínas que reconozcan modificaciones específicas de las histonas. Existe una correlación entre la acetilación de histonas y un aumento de transcripción que parece ser debido a que, tras acetilarse la histona, se une menos al DNA porque se produce su descompactación.

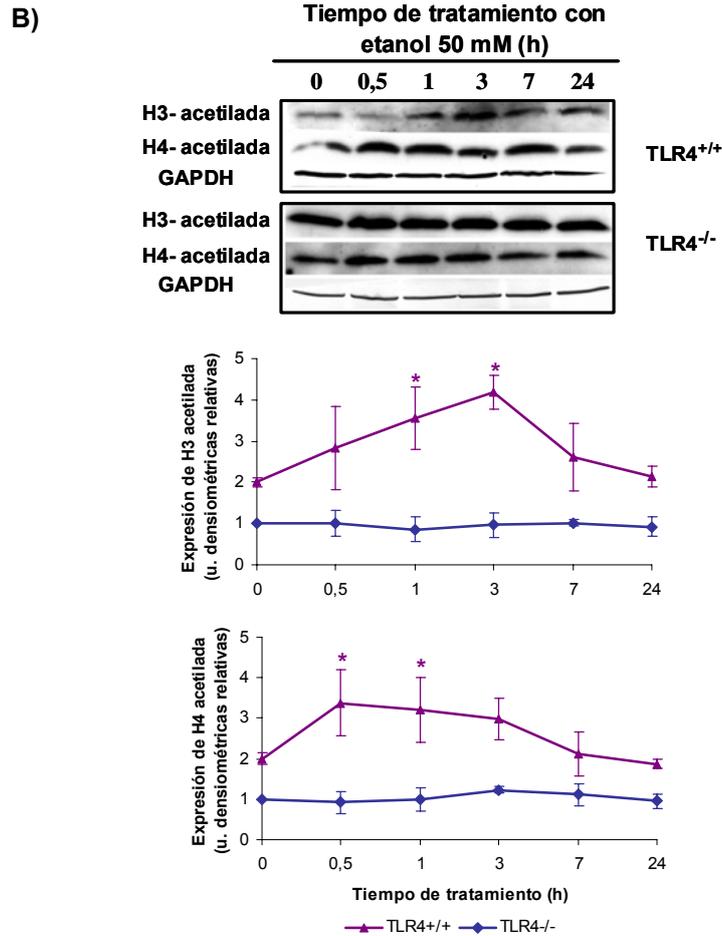
En este estudio hemos visto que el etanol activa diversos factores de transcripción como el NFκB, los factores IRF-1, IRF-3 y STAT-1. Por otra parte, hay trabajos que han relacionado la acetilación de histonas con un proceso inflamatorio (Ito et al., 2002; Rahman, 2002) por lo que nos planteamos analizar si el etanol es capaz de provocar estas modificaciones y si es necesaria la función del receptor TLR4 en este proceso. Para el estudio de estas modificaciones, se trataron cultivos primarios de microglía de rata con etanol 50 mM durante distintos tiempos y se analizó la acetilación de las histonas H3 y H4 mediante inmunotransferencia con anticuerpos que reconocen específicamente las formas acetiladas de esta proteínas.

La Figura 36 muestra que se produce un aumento en la acetilación de las histonas H3 y de H4 a partir de un tratamiento de 30 min, alcanzándose un máximo para histona H3 a este tiempo y para la histona

H4 tras 3 h de tratamiento (Figura 36.A). Para determinar la posible implicación del TLR4 en estas modificaciones, se utilizaron los cultivos de microglía procedentes de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> (Figura 36.B). En la figura se observa que únicamente se produce un incremento en la acetilación de las dos histonas cuando el receptor TLR4 es funcional. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el etanol causa un proceso inflamatorio a través de su interacción con el receptor TLR4 causando un efecto similar al producido por el LPS.

A)





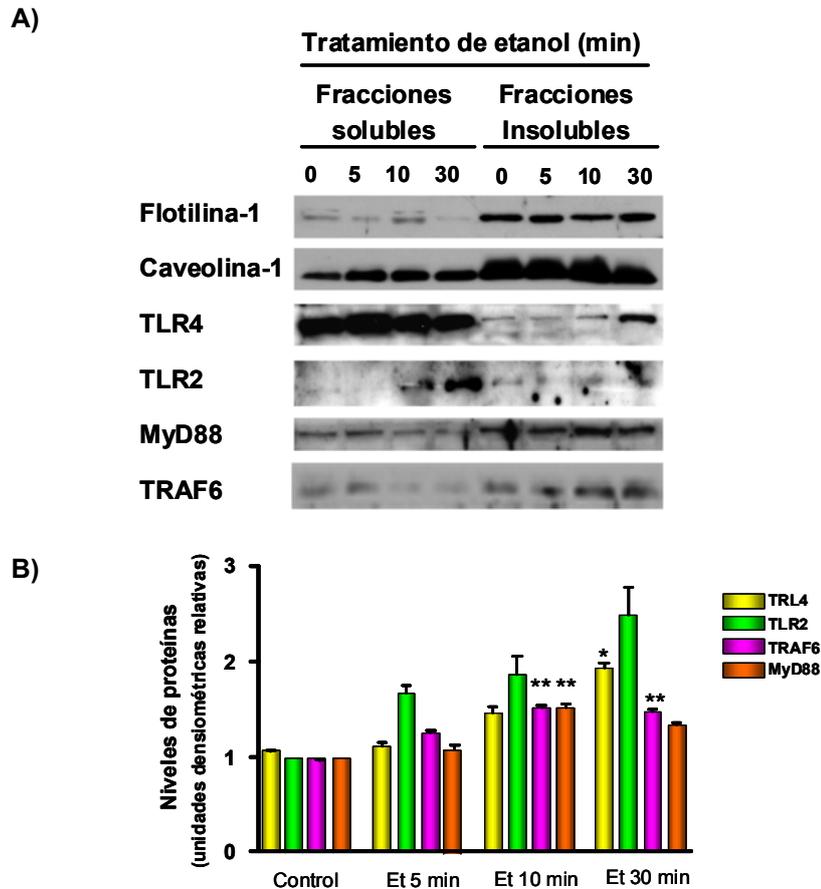
**Figura 36. El etanol provoca la acetilación histonas.** Las células microgliales procedentes de rata (A) y de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> (B) fueron tratadas con etanol 50 mM durante distintos tiempos. La acetilación de las histonas H3 y H4 se analizó por inmunotransferencia. Se muestra uno de los resultados representativos de un total de 7 experimentos independientes. Los datos de la cuantificación reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

#### 4.8. MECANISMO DE LAS INTERACCIONES DEL ETANOL CON LOS TLR EN MICROGLÍA: PAPEL DE LOS *LIPID RAFTS*

Nuestros estudios en células RAW 264.7 (Figura 19) demostraban que el etanol activa la vía de señalización MyD88-dependiente asociada al TLR4, promoviendo un reclutamiento de este receptor y de otras proteínas de la cascada en los microdominios de membrana *lipid rafts*. Además, en microglía se ha demostrado que el etanol es capaz de activar las vías MyD88-independiente y MyD88-dependiente asociadas al TLR4, ya que estas vías no se estimulan por el etanol en microglía de ratones deficientes en el TLR4. Sin embargo, se desconoce si el etanol activa ambas vías asociadas a los receptores TLR4 mediante su interacción con los *lipid rafts*, de la misma forma que lo hace en macrófagos o existen otros mecanismos.

##### 4.8.1. Papel de los *lipid rafts* en la activación de la microglía por el etanol

Para analizar si los *lipid rafts* están implicados en el mecanismo de activación del TLR4 por el etanol en microglía, se estudió la posible translocación del receptor TLR4 y otras proteínas asociadas a su vía de señalización hacia los estos microdominios. El hecho de trabajar con un cultivo primario limita la cantidad de proteína de la que se dispone. Por este motivo, se utilizó cultivo primario de rata y para el aislamiento de *lipid rafts* no se usa una centrifugación en gradiente de densidades, como en el caso de los macrófagos, sino se empleó otra aproximación experimental basada en un protocolo descrito en Kim y col. (Kim et al., 2006) para células microgliales. Esta última aproximación, se basa en tratar las células con Tritón X-100 y tras centrifugar, se obtienen dos fracciones: una correspondiente a proteínas solubles a Tritón X-100 a 4 °C y otra correspondiente a proteínas insolubles (*lipid rafts*).



**Figura 37. El etanol activa a la microglía a través de microdominios resistentes a detergentes.** A) El nivel de varias proteínas se analizó mediante inmunotransferencia en las fracciones solubles e insolubles a la lisis con Tritón X-100 0,5% en células microgliales de rata tratadas durante 5, 10, 30 min con etanol 50 mM. Se muestra una de las inmunotransferencias representativas. B) Cuantificación de los resultados obtenidos en las fracciones resistentes a la lisis con Tritón X-100. Los resultados reflejan la media  $\pm$  S.E.M., n=5 (\*p<0.05 y \*\*p<0.01 respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

En ambas fracciones se determinó la presencia de varias proteínas asociadas o no a los *lipid rafts*. La Figura 37 muestra los resultados obtenidos tras un tratamiento con etanol 50 mM de durante 5, 10 y 30 min.

Se puede observar que las fracciones insolubles están enriquecidas en caveolina-1 y flotilina-1, proteínas residentes de *lipid rafts*, lo que sirve de control del aislamiento de estos microdominios. Además se detecta un aumento de la cantidad del receptor TLR4 presente en las fracciones solubles tras 30 min de tratamiento con etanol. Al mismo tiempo se aprecia un aumento en las proteínas adaptadoras TRAF6 y MyD88 con el tratamiento con etanol. Estos resultados sugieren que la activación del TLR4 por el etanol se produce a través de sus interacciones con los *lipid rafts*, tal y como se demostró en los macrófagos.

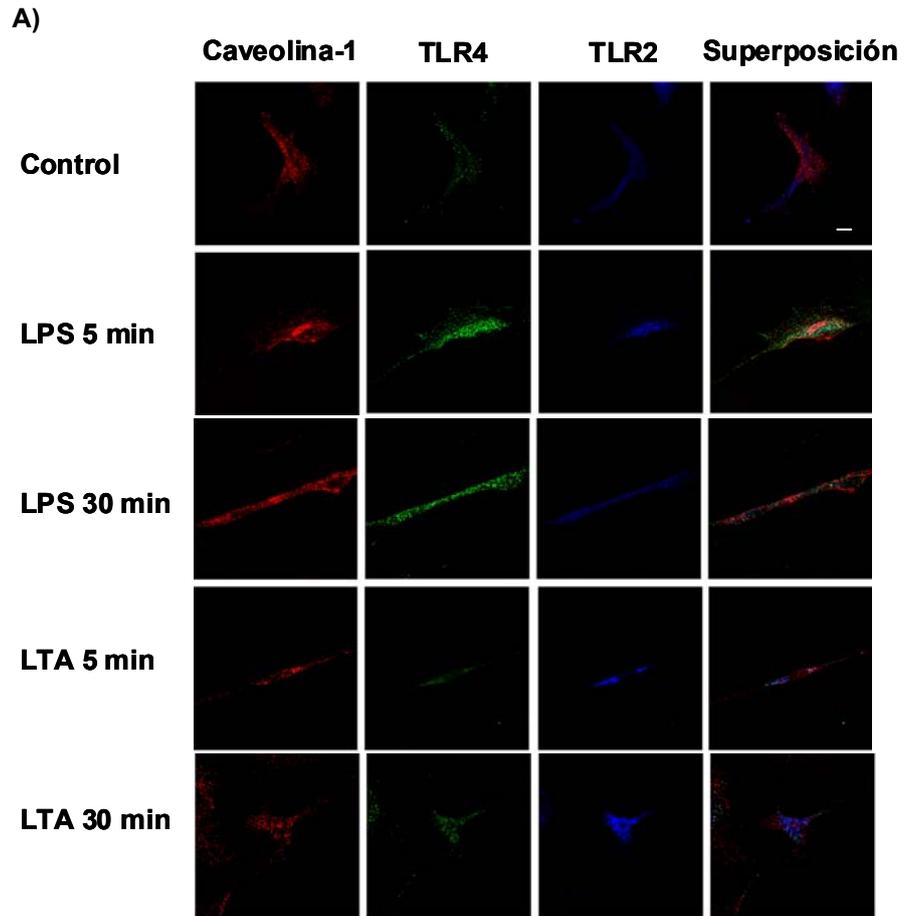
#### **4.8.2. Implicación del receptor TLR2 en la activación de la microglía por el etanol**

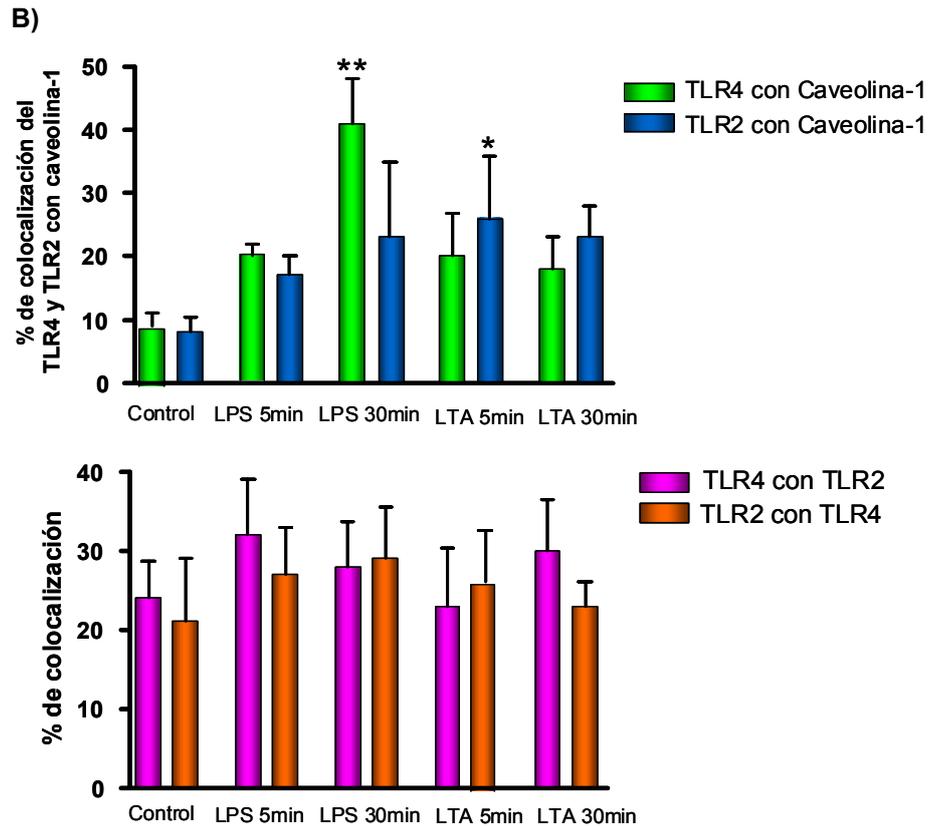
Con el objetivo de evaluar la posible implicación de otros receptores tipo Toll en la generación del proceso inflamatorio inducido por el etanol, se analizaron los efectos del etanol en el receptor TLR2. La activación de este receptor se produce también a través de los *lipid rafts* (Triantafilou et al., 2006; Triantafilou et al., 2004), por lo que nos planteamos que el etanol podría afectar a este otro miembro de la familia TLR. Por otra parte, el estudio de este receptor podría aclarar los efectos que ocasiona el consumo de alcohol en el SNC, pues el TLR2 se ha relacionado con el daño neural de diversas enfermedades degenerativas y con el daño producido por la activación de la microglía (Babcock et al., 2006; Lehnardt et al., 2007).

El TLR2 es un receptor capaz formar heterodímeros con otros miembros de su familia reconociendo así distintos ligandos. Su interacción con el receptor TLR6 le permite reconocer diacil-lipoproteínas o con el TLR1 reconocer triacil-lipoproteínas (Akira, 2003; Takeda and Akira, 2005). Los resultados obtenidos con esta metodología tras el tratamiento con etanol 50 mM no son concluyentes. Aunque parece producirse un aumento en la presencia de este receptor en los *lipid rafts*, no se ha obtenido un resultado estadísticamente significativo.

#### **4.8.3. La activación de los receptores TLR2 y TLR4 por sus ligandos promueve una translocación de los receptores a caveolas**

La activación de los receptores TLR4 y TLR2 por sus ligandos, LPS y LTA, provoca un movimiento y agrupamiento de estos receptores en los *lipid rafts* (Triantafilou et al., 2004). Hay que destacar, que existen varios tipos de *lipid rafts*. Se han descrito microdominios de membrana planos, ricos en flotilina-1 y otro tipo, llamado caveolas, rico en caveolina-1, que se ha relacionado con procesos de tráfico y transporte de proteínas (Le Roy and Wrana, 2005; Pike, 2003). Inicialmente nos planteamos analizar su localización cuando se estimulan estos dos receptores con sus ligandos. Para estudiar el papel de estos microdominios en el mecanismo de activación de los receptores TLR4 y TLR2 y debido a la limitación en el número de células cuando se trabaja con cultivo primario, se evaluó la posible colocalización del receptor TLR4 y del TLR2 con la flotilina-1 y con la caveolina-1 utilizando microscopía confocal. Para estos experimentos, las células de microglía se estimularon con LPS 50 ng/ml o con LTA 1 µg/ml durante 5, 10 y 30 min y se analizó la colocalización de estos receptores con los dos marcadores de *lipid rafts*. Al estudiar la colocalización con la flotilina-1, no se aprecia un aumento significativo ni con el tratamiento con LPS ni con LTA. Sin embargo, cuando se analiza la colocalización de los dos receptores con la caveolina-1, observamos que el TLR4 colocaliza con caveolas tras 30 min de estimulación con LPS, mientras que en el caso del TLR2 se observa un aumento significativo a los 5 min (Figura 38). Además, puesto que el TLR2 puede formar heterodímeros con otros miembros de la familia de los receptores TLR (Takeda and Akira, 2005), evaluamos la posibilidad de que los receptores TLR4 y el TLR2 pudieran formar heterodímeros. Sin embargo, ni el tratamiento con LPS, ni con LTA modificaron significativamente el porcentaje de colocalización de estos dos receptores.





**Figura 38. Los receptores TLR4 y TLR2 se reclutan a caveolas tras el tratamiento con LPS y LTA.** A) La microglía se trató con LPS y LTA 5, 10 y 30 min y se analizó mediante microscopía confocal la localización de la caveolina-1 y de los receptores TLR4 y TLR2. Se muestra una micrografía representativa de los 3 cultivos analizados (barra de escala= 10  $\mu$ m). Los resultados reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\*<0.05 y \*\*<0.01 respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

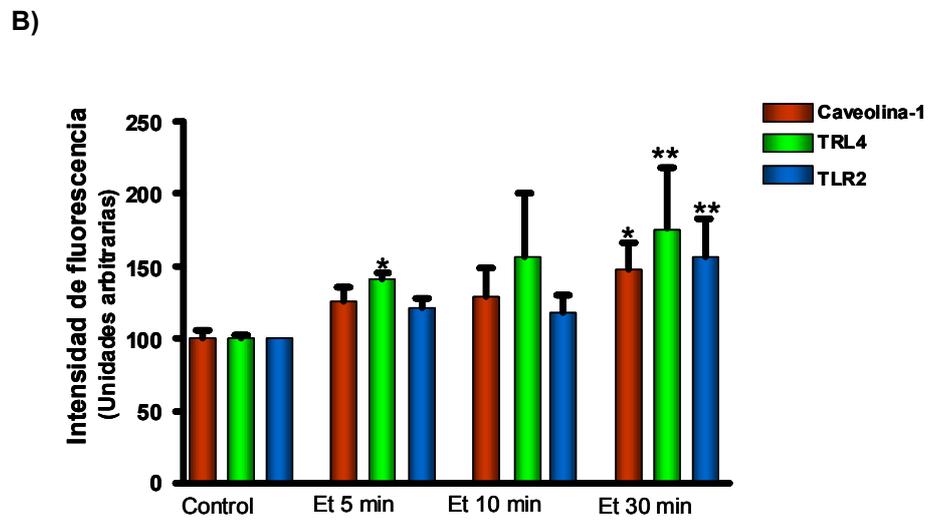
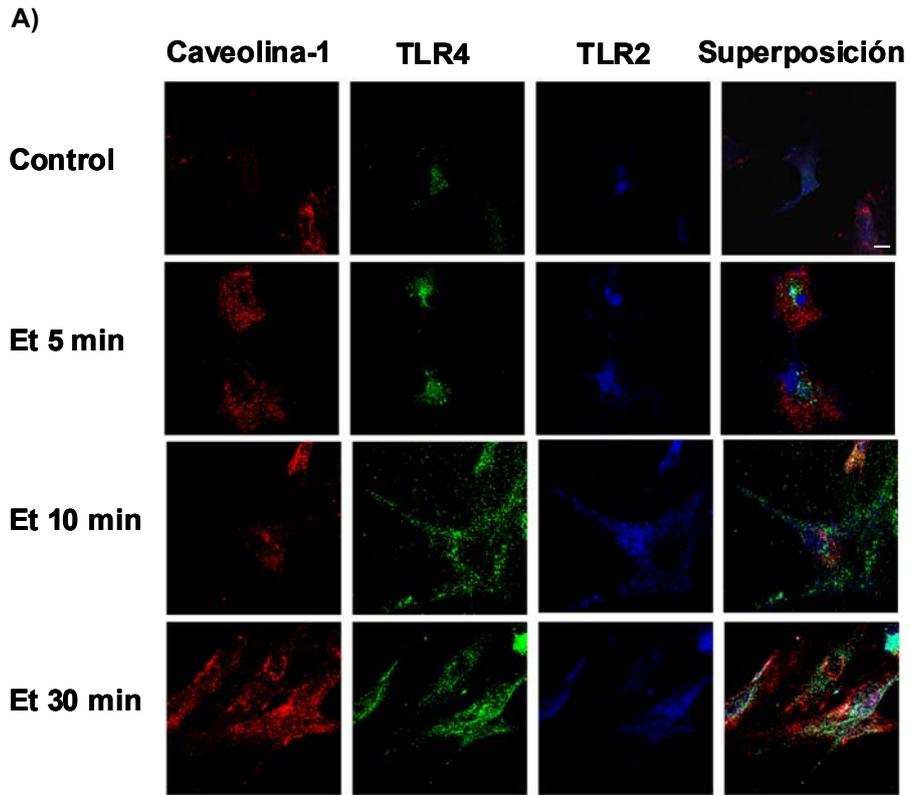
#### 4.8.4. El etanol modifica la localización en membrana de los receptores TLR2 y TLR4

Para determinar si el etanol inducía cambios en la localización de los receptores TLR4 y TLR2 en los microdominios de membrana ricos en flotilina y en caveolas, similares a los que causan sus ligandos, se analizó la

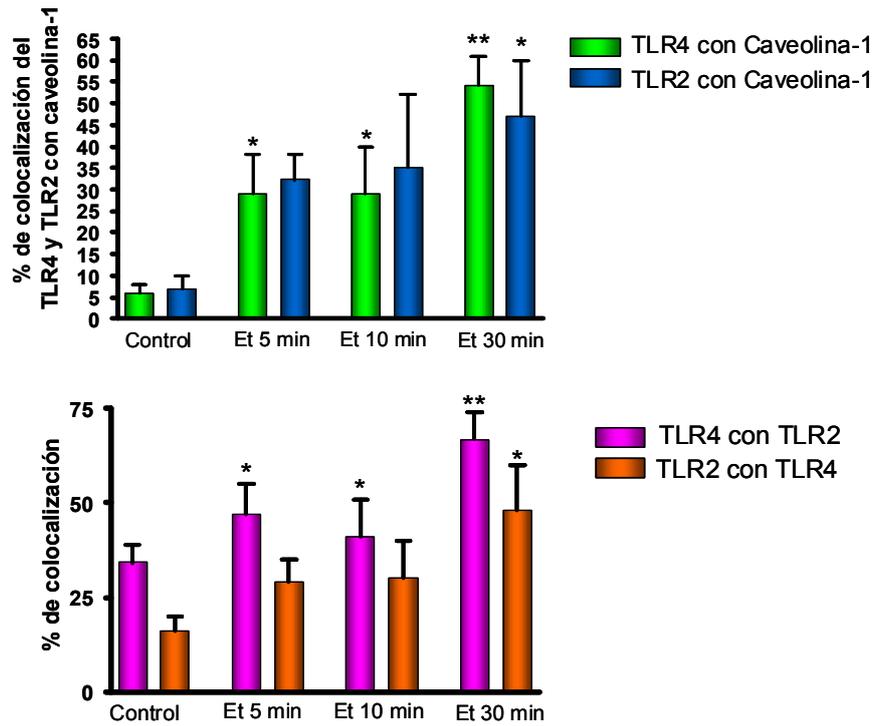
colocalización del TLR4 y del TLR2 con la flotilina-1 y con la caveolina-1 mediante microscopía confocal. La microglía se estimuló con etanol 50 mM durante 5, 10 y 30 min. La expresión de las proteínas se determinó mediante la cuantificación de la intensidad de fluorescencia.

La Figura 39 muestra que, tras 5 y 30 min de tratamiento con etanol, se produce un aumento significativo en la expresión del receptor TLR4. A pesar de ser tiempos cortos, se ha descrito anteriormente que se producen incrementos en la intensidad de fluorescencia de dicho receptor y un cambio en su distribución en la membrana en macrófagos tras el tratamiento con LPS desde los 3 min (Dai and Pruett, 2006b). Nuestros resultados también muestran un aumento en los niveles de caveolina-1 y del TLR2 tras 30 min de tratamiento. Al analizar la localización de estas proteínas, como ocurría con los tratamientos con LPS y LTA, no se observan cambios en la medida de la colocalización de estos receptores con la flotilina-1. En células sin estimular, únicamente el 17%  $\pm$ 10 de la señal TLR4 y el 14%  $\pm$ 6 del TLR2 colocaliza con la flotilina-1. El tratamiento con etanol no modifica significativamente estos valores. En el caso de la colocalización con la caveolina-1, observamos como el receptor TLR4 se mueve rápidamente hacia estos microdominios (a partir de 5 min) y que el receptor TLR2 también lo hace, aunque a tiempos más largos, 30 min (Figura 39).

Este figura también muestra como el tratamiento con etanol hace que aumente el porcentaje de TLR4 que colocaliza con el TLR2. Se ha descrito que tras la estimulación de estos dos receptores por sus ligandos LPS y LTA, se produce un reclutamiento hacia los *lipid rafts* (Triantafilou et al., 2004). Los resultados obtenidos sugieren que el etanol, a través de sus efectos en los *lipid rafts*, podría promover la aproximación de ambos receptores.



C)



**Figura 39. Los receptores TLR4 y TLR2 se reclutan a caveolas tras el tratamiento con etanol.** La microglía se trató con 50 mM de etanol durante 5, 10 y 30 min y se analizó mediante microscopía confocal (A), determinándose la intensidad de marcaje de TLR4, TLR2 y caveolina-1 (B) y su localización (C). Se muestra una micrografía representativa tras 3 cultivos analizados (barra de escala= 10  $\mu$ m). Los resultados reflejan la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<$ 0.05 y \*\* $<$ 0.01 respecto al valor del control con un test de ANOVA de una vía).

#### 4.9. EFECTOS DE DOSIS DE AGUDAS DE ETANOL SOBRE LA INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA EN MACRÓFAGOS PERITONEALES: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4

Tras analizar los efectos que ejercen dosis agudas del etanol *in vitro* en las células RAW 264.7 y en el cultivo primario de microglía, nos planteamos analizar los efectos que podría ejercer el tratamiento de etanol *in vivo* sobre los macrófagos peritoneales. Los macrófagos desempeñan un papel importante en la inducción y regulación de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa; actúan de células presentadoras de antígenos captando, procesando y presentando antígenos a los linfocitos T. El reconocimiento del antígeno por las células T exige que previamente sea procesado proteolíticamente en el interior de los macrófagos. La respuesta de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, viene dada por el origen de los antígenos que reconocen, que a su vez, se relaciona con la vía por la que estos antígenos han sido procesados. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> reconocen antígenos expuestos en el contexto de las moléculas MHC de clase II de las células presentadoras de antígeno que han sido procesados por vía exógena en el sistema endosomal. Los linfocitos citotóxicos CD8<sup>+</sup> reconocen a los antígenos que han sido procesados endógenamente en el citosol de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I (Abbas et al., 1995).

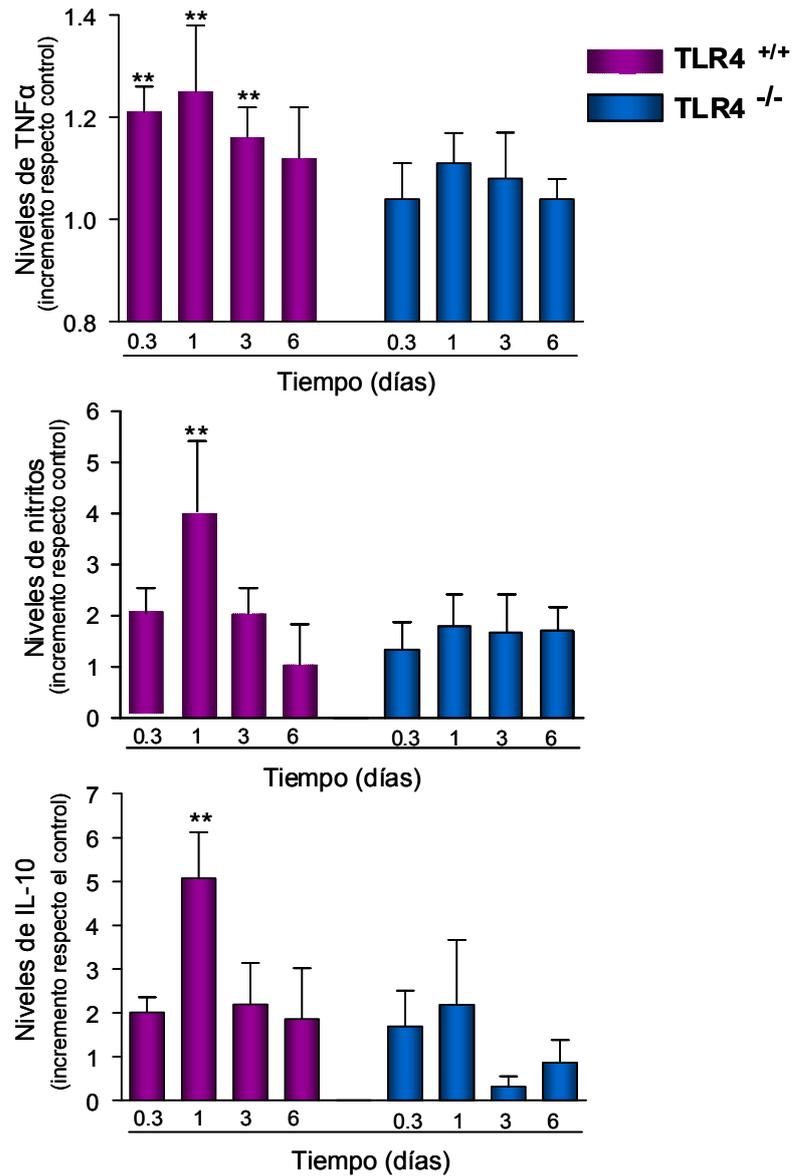
La cavidad peritoneal de los ratones se ha utilizado como modelo para el estudio de procesos inflamatorios asociados con la activación de macrófagos (Pruett et al., 2004a; Pruet et al., 2004b). Por este motivo nos planteamos estudiar los efectos del etanol y el papel del receptor TLR4 en macrófagos peritoneales procedentes de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>.

#### **4.9.1. El etanol induce un incremento en la producción de TNF- $\alpha$ , NO e IL-10 en la cavidad peritoneal a través del TLR4.**

Para analizar el efecto del etanol sobre la posible estimulación de los macrófagos peritoneales, se administró una dosis de etanol (4g/kg), mediante una inyección intraperitoneal. Posteriormente se recogió el lavado peritoneal a diferentes tiempos tras la administración del etanol y se determinó la producción de nitritos, TNF- $\alpha$  e IL-10.

En la Figura 40 se observa como el etanol es capaz de inducir una respuesta inflamatoria en macrófagos peritoneales de ratones TLR4<sup>+/+</sup>. En esta figura se observa que los niveles de TNF- $\alpha$  aumentan significativamente a las 7 h de la administración de etanol y se mantienen elevados durante 3 días, mientras que los niveles de NO alcanzan un valor máximo a las 24 h de tratamiento y disminuyen posteriormente. Los valores de ambos efectores en lavado peritoneal se normalizan tras 6 días de tratamiento. Cuando se administra intraperitonealmente etanol a la misma dosis a ratones deficientes en la función para el receptor TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) no se aprecian cambios significativos en los niveles de NO ni de TNF- $\alpha$  en el lavado peritoneal obtenido tras los diferentes tiempos de la administración del etanol, sugiriendo que el etanol activa a los macrófagos peritoneales a través del receptor TLR4 para generar estos mediadores inflamatorios.

Por otra parte, la figura 40 muestra que al igual que ocurre con las células RAW 264.7, el tratamiento de etanol aumenta los niveles de IL-10 24 horas después de la administración del etanol a ratones TLR4<sup>+/+</sup>. Sin embargo, no se aprecian cambios significativos en los niveles de esta citocina anti-inflamatoria en ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Estos resultados indican que el alcohol es capaz de producir citocinas inflamatorias y anti-inflamatorias a través de la activación de los receptores TLR4.

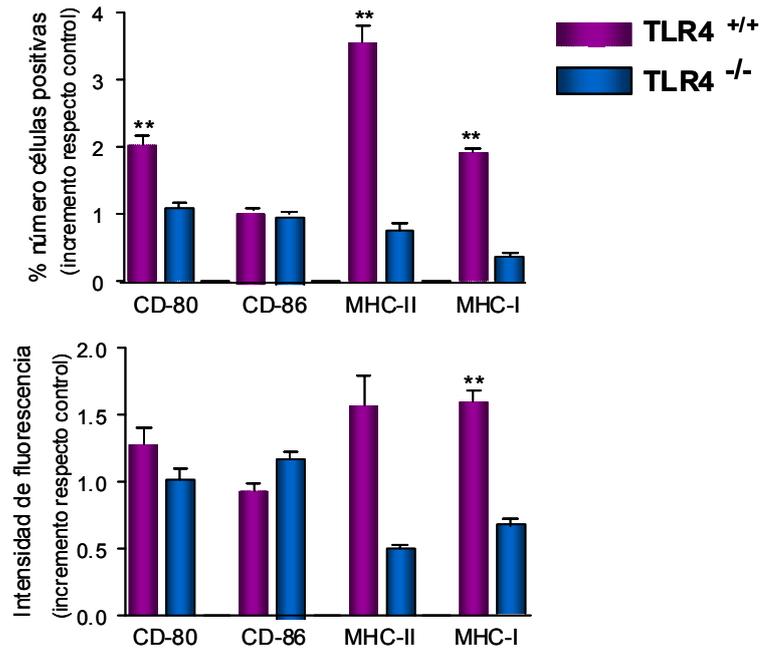


**Figura 40. Medida de los niveles de TNF- $\alpha$ , nitritos e IL-10 en el lavado peritoneal tras el tratamiento con etanol.** Ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se trataron con una dosis intraperitoneal del etanol (4 g/kg). Posteriormente a las 7 h y 1, 3 y 6 días de la administración de etanol, se recogió el lavado peritoneal y se determinó el nivel de TNF- $\alpha$  mediante ELISA y de nitritos mediante la reacción de Griess. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de un total de 10 experimentos (\*<0.05 y \*\*<0.01 respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía).

#### **4.9.2. Estudio de la expresión de moléculas MHC tras el tratamiento con etanol en macrófagos peritoneales**

Como ya se ha comentado, una de las funciones de los macrófagos es actuar como célula presentadora de antígenos. Al iniciarse una respuesta inmunitaria innata y aumentar el nivel de citocinas, éstas son capaces de modular la expresión de moléculas de clase I y de clase II del MHC, además de otras moléculas coestimuladoras en los macrófagos (Duque Correa and Rojas López, 2007). La activación del linfocito T necesita dos señales de la célula presentadora de antígenos, la molécula de MHC con el péptido procesado (que se unirá al TCR del linfocito) y las moléculas coestimuladoras. La señal coestimuladora más importante es la formada por la familia B7, B7-1, también llamada CD80 y B7-2 ó CD86 que interactúan con CD28 del linfocito T (Lenschow et al., 1996).

Algunos estudios indican que los receptores tipo Toll no sólo participan en la respuesta inmunitaria innata contra las infecciones microbianas, sino que también coordinan y actúan como control en la inmunidad adaptativa (Iwasaki and Medzhitov, 2004). Por tanto con el objeto de analizar un posible papel del receptor TLR4 en la respuesta adaptativa en macrófagos peritoneales, ratones control (TLR4<sup>+/+</sup>) y deficientes en este receptor (TLR4<sup>-/-</sup>) se trataron con el LPS (500 µg por ratón). Esta dosis de LPS se ha empleado en otros trabajos anteriores para la estimulación de macrófagos mediante inyección intraperitoneal (Dai and Pruet, 2006a). Tres días después de la administración de LPS, los macrófagos peritoneales se aislaron y se analizó la expresión de las moléculas MHC de clase I y II y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Los resultados obtenidos se relativizaron respecto a la población F4/80 positiva, que se utilizó como marcador de macrófagos.



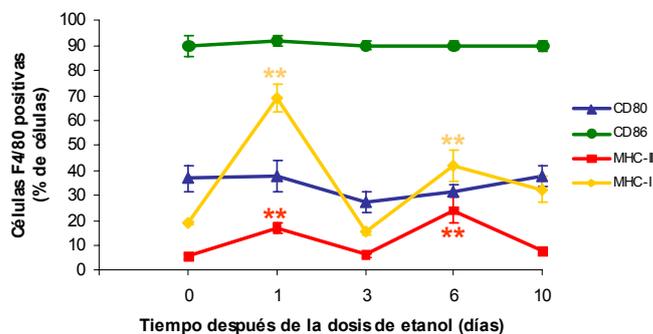
**Figura 41. Efectos del tratamiento con el LPS en las moléculas MHC-I, MHC-II y coestimuladoras.** Ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se trataron con una dosis de LPS de 500 µg/ratón. Tres días después del tratamiento, se aislaron los macrófagos peritoneales y se determinaron los niveles de MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la media ± S.E.M. de un total de 12 experimentos (\*<0.05 y \*\*<0.01 respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía).

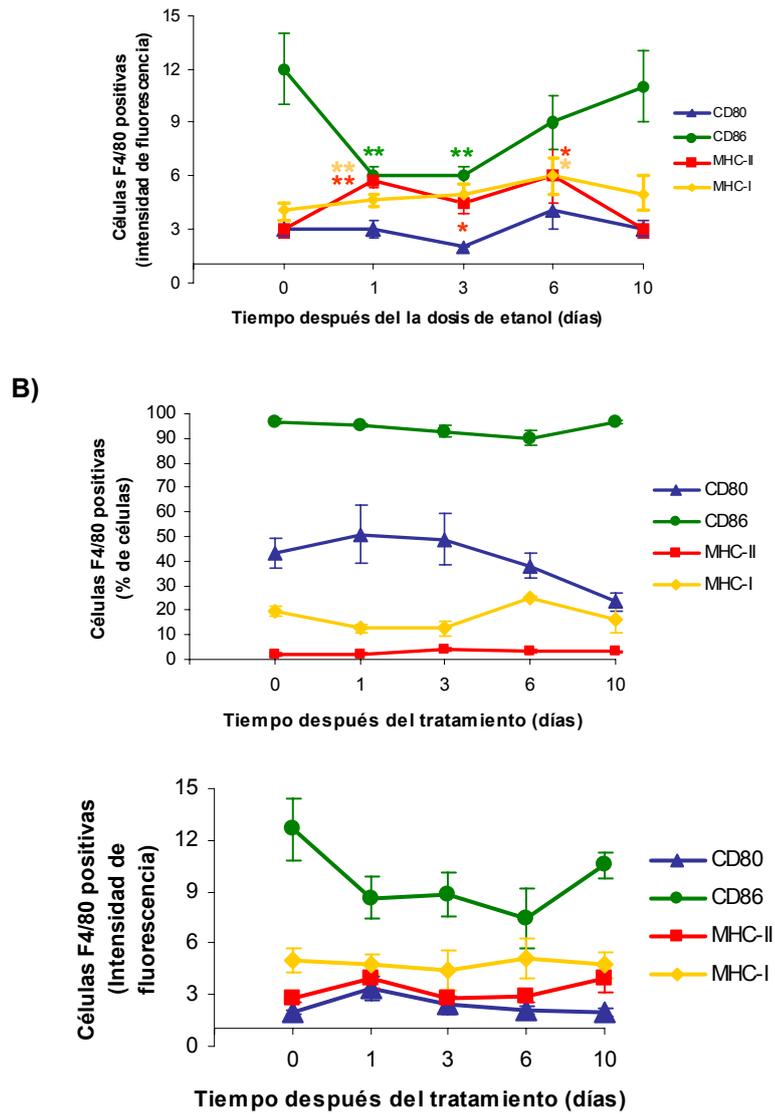
La Figura 41 muestra que el tratamiento con LPS aumenta significativamente el número de células que expresan CD80, MHC-I y MHC-II e incrementa la expresión de MHC-I. Por el contrario y como se esperaba, no se observaron cambios significativos en los anteriores parámetros tras el tratamiento con el LPS en los macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup>.

Estudios previos han demostrado que el consumo de etanol modula la respuesta de las células presentadoras de antígenos. Estos efectos varían en función de la dosis y del tipo celular (Lau et al., 2009). Con el

objetivo de estudiar los efectos del etanol en la expresión de estas moléculas en macrófagos peritoneales y el papel de los receptores TLR4 en la respuesta adaptativa, ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> se trataron con una dosis de etanol de 4 g/kg. Posteriormente se procedió al aislamiento de los macrófagos peritoneales tras 1, 3, 6 y 10 días del tratamiento y se analizó por citometría de flujo la expresión de las moléculas de clase I y II del MHC y moléculas coestimuladoras de las células F4/80 positivas (marcador de macrófagos). La Figura 42.A muestra que el tratamiento con etanol incrementa el número de células que expresan las moléculas de la clase I y II del MHC tras 1 y 6 días de la estimulación con etanol, así como un aumento en su expresión. Al mismo tiempo, mientras que los niveles de CD80 no sufrieron cambios en su expresión, los niveles de CD86 disminuyeron significativamente a las 24 y 72 horas del tratamiento con etanol. Por el contrario, los macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup> mostraron un comportamiento diferente ya que no se observaron cambios significativos en los niveles de expresión de las moléculas de la clase I y II del MHC y ni de las moléculas co-estimuladoras (Figura 42.B).

A)





**Figura 42. Efectos del tratamiento con etanol en las moléculas MHC-I, MHC-II y coestimuladoras.** Los ratones se trataron con una dosis de etanol 4 g/kg al 25%. Se aislaron los macrófagos sin tratar (0), y después de 1, 3, 6 y 10 días. Se determinó el porcentaje de células que presentan MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 y su intensidad en ratones TLR4<sup>+/+</sup> (A) y TLR4<sup>-/-</sup> (B) por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de un total de 12 individuos por grupo (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía).

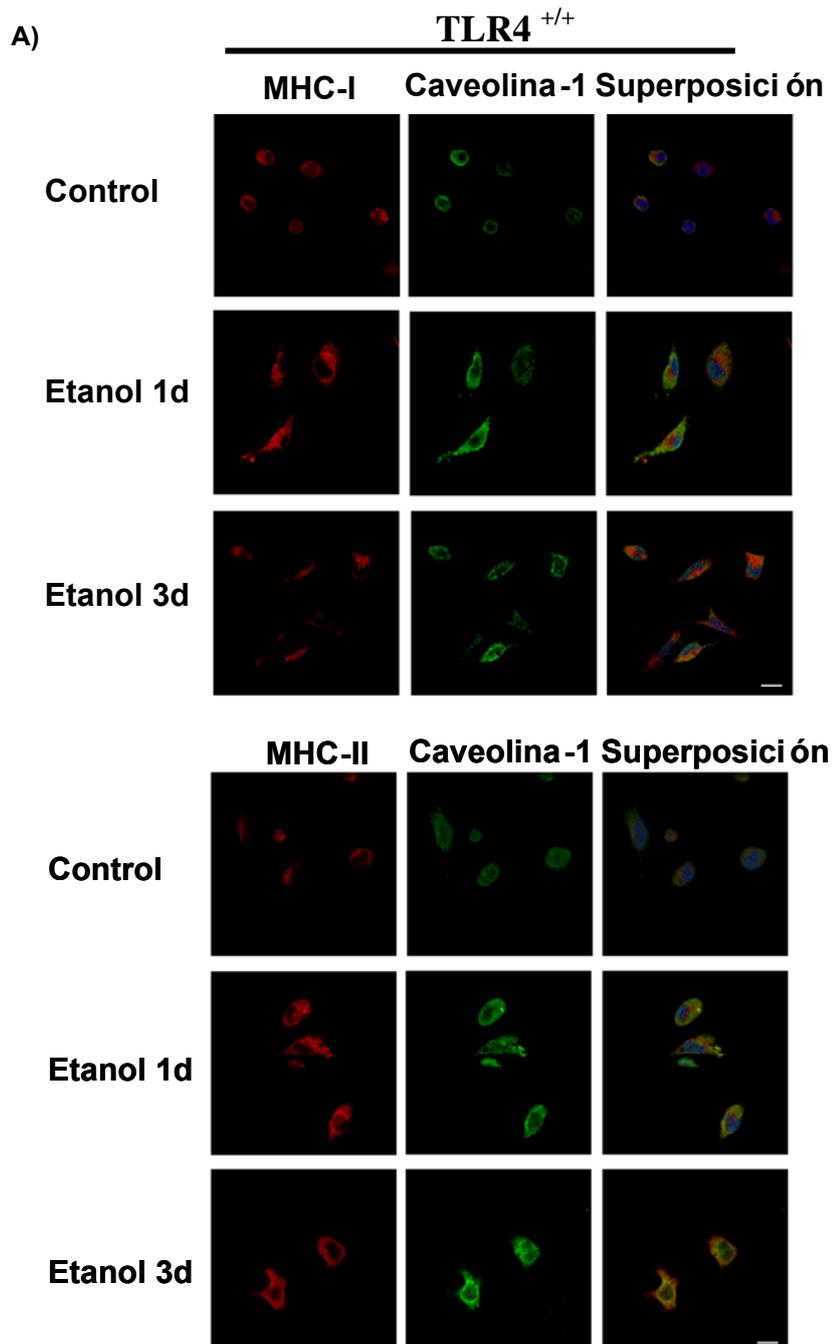
#### **4.9.3. El etanol modula la asociación de las moléculas de clase I y II del MHC con los *lipid rafts***

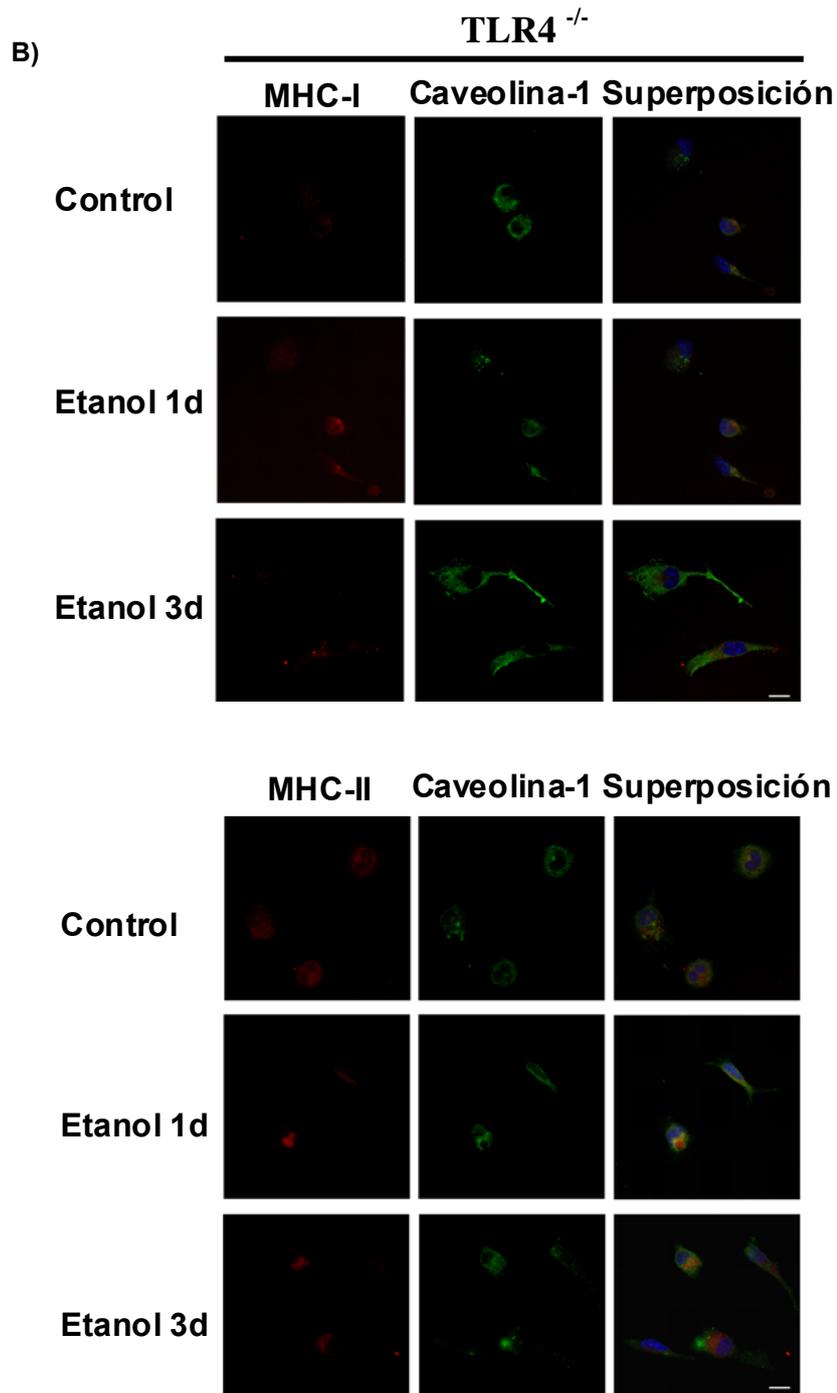
Los microdominios de membrana *lipid rafts* se han relacionado con el proceso de internalización de diversos patógenos (Manes et al., 2003). Se ha descrito la localización de las moléculas de MHC de clase II en estos microdominios de membrana y de esta forma se facilitaría la concentración del complejo MHC II-péptido y la presentación antigénica. Sin embargo, hasta el momento no se dispone de muchos datos de las interacciones entre las moléculas MHC-I y los *rafts* (Hiltbold et al., 2003).

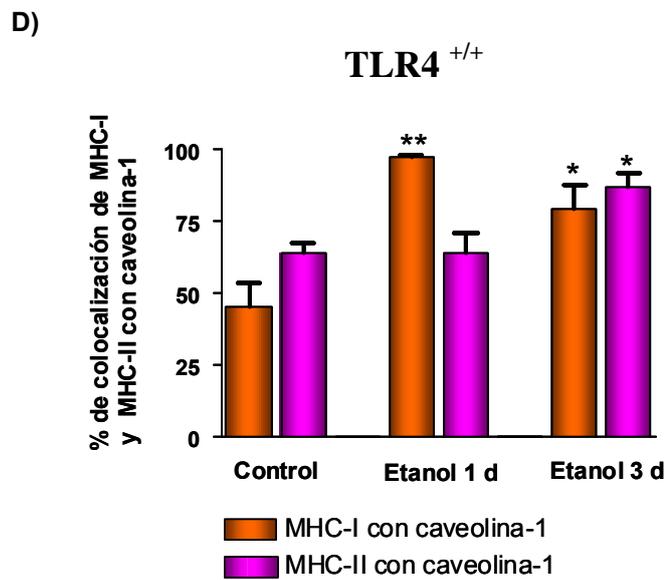
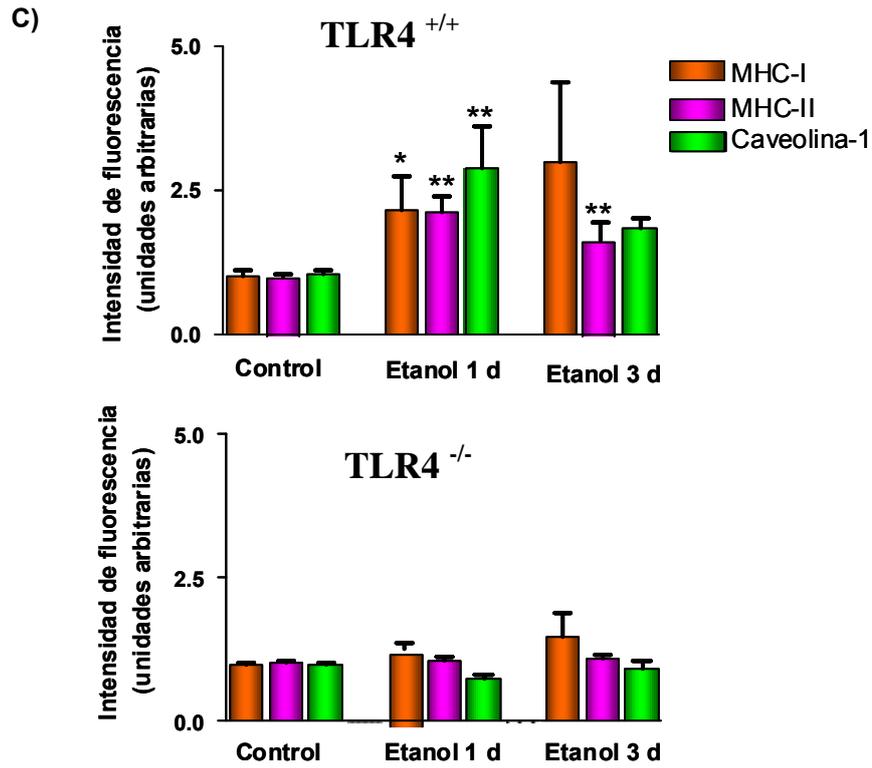
Puesto que la caveolina-1 se ha relacionado con procesos de endocitosis en muchos tipos celulares eucariotas (Pelkmans, 2004 #208), se ha estudiado la posible asociación de las moléculas MHC-I y MHC-II con la caveolina-1 en macrófagos de ratones tratados y no tratados con etanol. Para ello se administró una dosis de etanol y se aislaron los macrófagos 1 y 3 días después. Las células se sembraron sobre cristales y se analizó la localización de las moléculas MHC mediante microscopía confocal. La Figura 43.A muestra como 24 horas después del tratamiento con etanol se produce un incremento en la expresión de la caveolina-1, así como un incremento en la expresión de las moléculas MHC de clase I y II a las 24 y 72 horas del tratamiento. Al realizar el mismo experimento con macrófagos procedentes de ratones deficientes en TLR4, no se observaron cambios significativos en la expresión de estas proteínas tras el tratamiento con etanol (Figura 43.B). Estos resultados confirman los datos obtenidos mediante citometría de flujo (Figura 42).

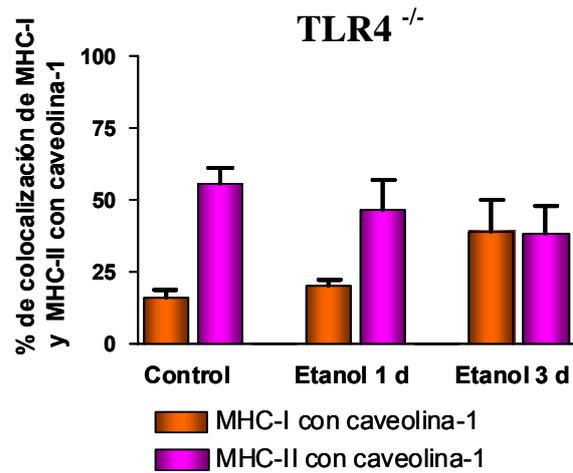
Las acciones del etanol se han relacionado con su capacidad de interaccionar con lípidos. Nuestros resultados han mostrado cómo este agente actúa a través de los *lipid rafts* tanto en las células RAW 264.7 como en las de microglía. Por tanto, es posible sugerir que los efectos del etanol en las moléculas de MHC en macrófagos podrían ser debidos o a su acción directa sobre los *lipid rafts* o a través de los efectos del etanol sobre activación del receptor TLR4. Para discernir entre estas dos posibilidades, lo

primero que analizamos fue evaluar si el etanol era capaz de inducir la asociación de las moléculas MHC I y II con los *lipid rafts*. Esta posibilidad se abordó mediante microscopia confocal analizando el marcaje de las moléculas MHC-I, MHC-II y su colocalización con la flotilina-1 y caveolina-1. Al estudiar la colocalización con el marcador de *lipid rafts* flotilina-1, no se encuentran cambios significativos entre las células procedentes del grupo control y tratado. La Figura 43.D muestra los resultados obtenidos al analizar la asociación de estas moléculas con caveolina-1. En los macrófagos de ratones no tratados, el 45% de las moléculas MHC de clase I y el 64% de las moléculas MHC de clase II colocalizan con la caveolina-1. Estos porcentajes disminuyen en el caso de macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Igualmente, la Figura 43.C muestra que, tras 24 horas del tratamiento con etanol aumenta la colocalización de las moléculas MHC de clase I con la caveolina-1, mientras que 3 días tras la inyección de etanol se observa un incremento significativo en la colocalización de las moléculas MHC de clase I y II con este marcador de *lipid rafts*. Sorprendentemente, en los macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup> no se observaron variaciones en las colocalizaciones de MHC I y II con la caveolina-1. Estos resultados parecen indicar que el TLR4 está participando/modulando en el efecto del etanol sobre la expresión del MCH I y II y su asociación con caveolas.







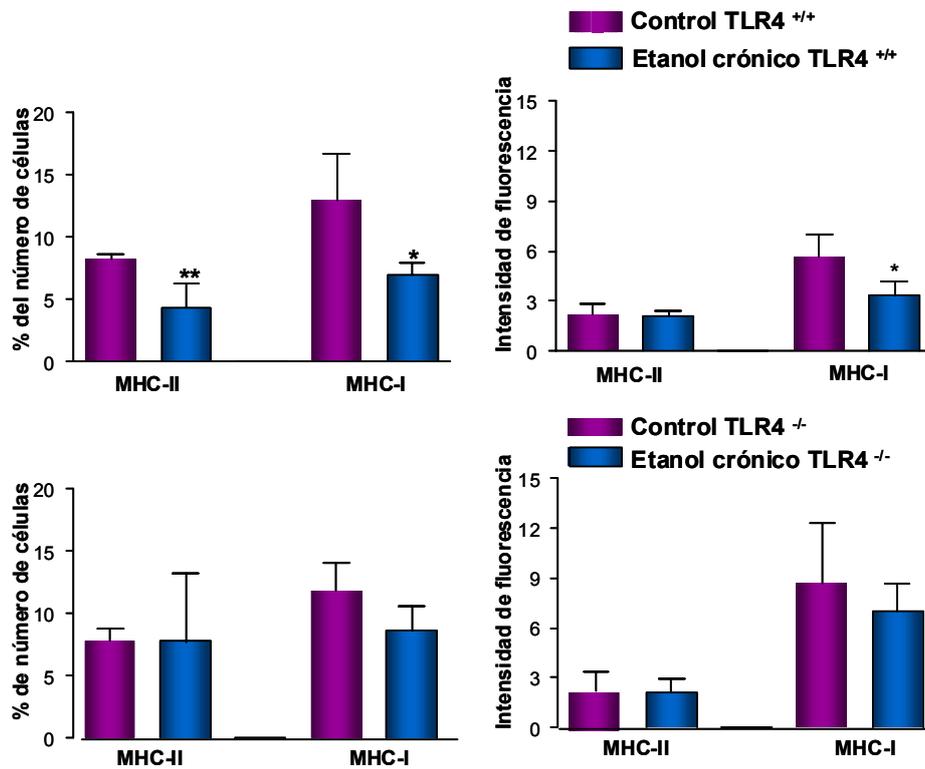


**Figura 43. El receptor TLR4 participa en el reclutamiento hacia caveolas de las moléculas MHC-I y MHC-II.** Ratones TLR4<sup>+/+</sup> (A) y TLR4<sup>-/-</sup> (B) se trataron con una dosis de etanol 4 g/kg al 25%. Los macrófagos peritoneales se aislaron y se analizó mediante microscopía confocal la intensidad del marcaje de las moléculas MHC-I, MHC-II y caveolina-1 (C) y su colocalización (D). Se muestra una micrografía representativa tras realizar 5 experimentos. Los resultados se representan como la media  $\pm$  S.E.M. (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al valor del grupo control con un test de ANOVA de una vía). La barra de escala equivale a 10  $\mu$ m.

#### **4.10. EFECTOS DEL CONSUMO CRÓNICO DE ETANOL SOBRE LAS MOLÉCULAS MHC-I Y MHC-II EN MACRÓFAGOS PERITONEALES: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4**

Como modelo de alcoholización crónica hemos utilizado ratones alcoholizados 5 meses con etanol al 10% en la bebida. La administración de etanol a los animales se realizó de forma progresiva, empleando concentraciones crecientes, 2, 4, 6, 8 y, finalmente, 10%. Con el objetivo de analizar el efecto del consumo crónico sobre las moléculas MHC-I y MHC-II y la posible implicación del receptor TLR4, se aislaron macrófagos peritoneales de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>, controles y alcoholizados durante 5 meses y se determinó el porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> que expresan estas moléculas y su intensidad (Figura 44).

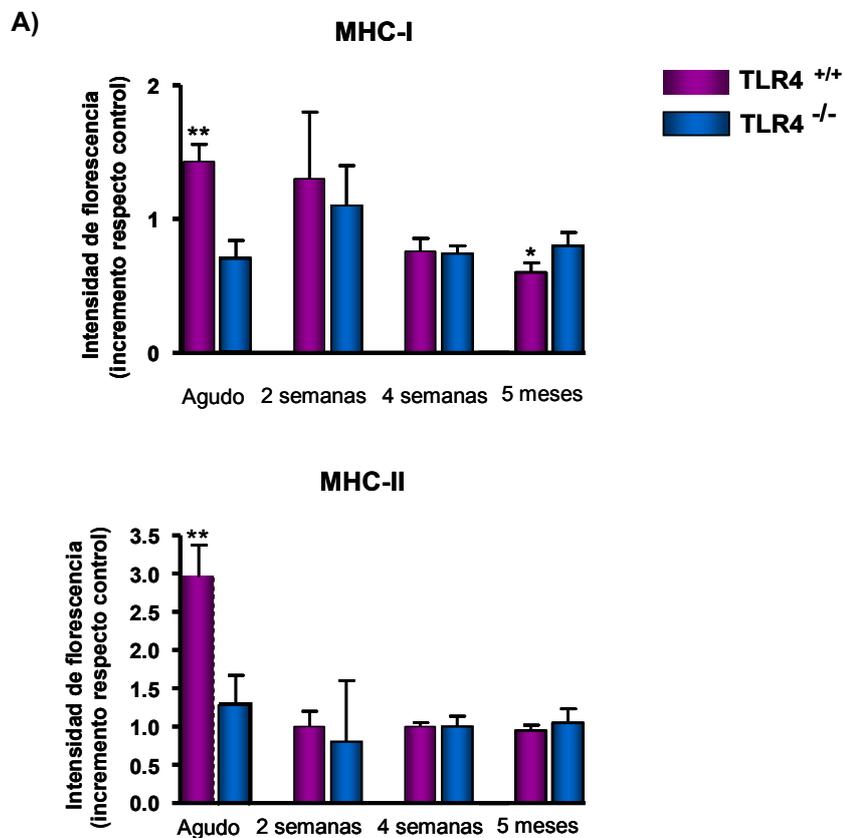
No se observan cambios significativos en los niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 con el tratamiento crónico de etanol, pero sí se observa un descenso en el número de células que expresan MHC-I y MHC-II y de la expresión total de MHC-I por célula, al comparar con los resultados obtenidos en los ratones del grupo control. En ratones deficientes en el receptor TLR4 no se observan cambios en estos niveles. Estos resultados apoyan la idea de que el consumo crónico de etanol, a través de sus efectos en el sistema inmunitario, aumenta el riesgo a padecer infecciones {Szabo, 2009 #138} y en estos efectos parece estar implicado el receptor TLR4.

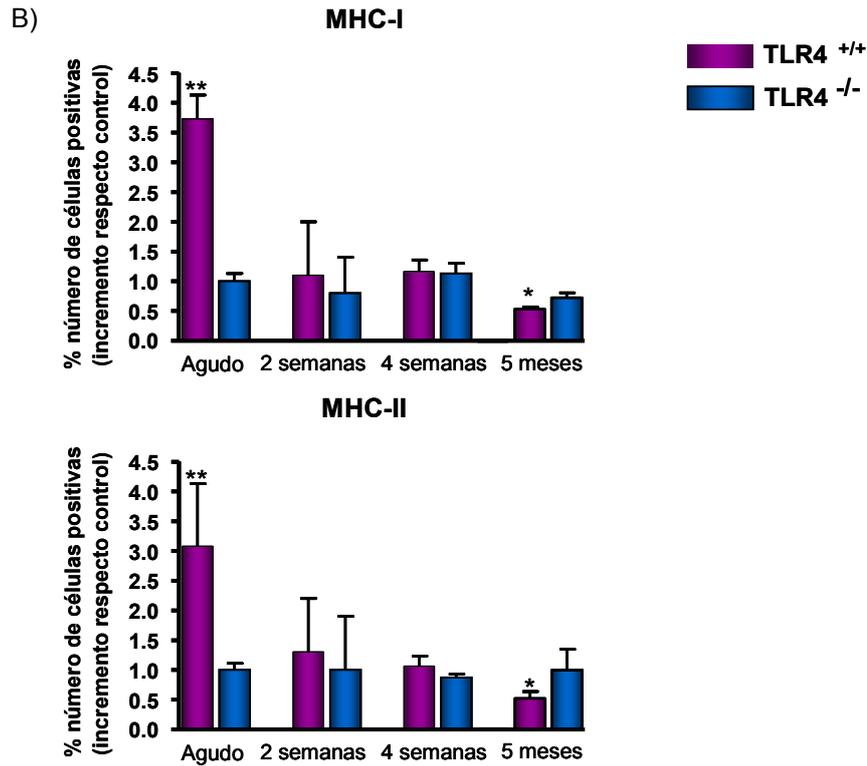


**Figura 44. Efectos del consumo crónico de etanol en las moléculas MHC-I y MHC-II.** El porcentaje de población positiva para MHC-I y MHC-II se determinó en macrófagos peritoneales, así como la intensidad de la señal por citometría de flujo de ratones TLR4<sup>+/+</sup> controles y alcoholizados y TLR4<sup>-/-</sup> controles y alcoholizados. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de un total de 8 experimentos (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía).

Los efectos del etanol sobre el sistema inmunitario dependen de varios factores como la dosis y del tiempo de tratamiento. Nuestros resultados indican que mientras que una dosis de etanol vía intraperitoneal incrementa los niveles de expresión y en el número de células que expresan MHC-I y MHC-II en macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>+/+</sup> (Figura

42), el consumo crónico durante 5 semanas causa un descenso en la expresión de MHC-I y en el número de células que expresan MHC-I y MHC-II en estos mismos ratones (Figura 44). Es por ello por lo que analizamos los efectos de consumo crónico en la expresión de las moléculas MHC tras cortos periodos de tiempo de consumo de alcohol, como fueron 2 y 4 semanas. Los resultados demuestran que tratamientos crónicos cortos no alteran la expresión de las moléculas MHC tanto en los ratones TLR4<sup>+/+</sup> como en los TLR4<sup>-/-</sup> (Figura 45), resultados que sugieren procesos adaptativos.





**Figura 45. Efectos de distintos tiempos de consumo de etanol en las moléculas MHC-I y MHC-II.** Se determinó en macrófagos peritoneales de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup> tratados con etanol intraperitonealmente (1 dosis) o en la bebida al 10% durante 2, 4 semanas o 5 meses, el porcentaje de población positiva para MHC-I y MHC-II, así como la intensidad de la señal por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  S.E.M. de un total de 5-12 experimentos (\* $<0.05$  y \*\* $<0.01$  respecto al grupo control con un test de ANOVA de una vía)



## **5. DISCUSIÓN**



## **5.1. EL ETANOL MODULA LA RESPUESTA INMUNITARIA DE LOS MACRÓFAGOS**

### **5.1.1. Acciones del etanol sobre la respuesta inmunitaria innata**

Los macrófagos desempeñan un papel esencial en la respuesta inmunitaria y en la defensa frente a las infecciones. Uno de los mecanismos utilizados por los macrófagos para combatir microorganismos patógenos invasores es a través de la activación de los receptores TLR. La estimulación de estos receptores inicia una respuesta inmunitaria innata que provoca la inducción de genes de respuesta rápida que codifican para citocinas y mediadores inflamatorios que son esenciales para la eliminación de la infección. A pesar de ello, dependiendo de la intensidad y de la duración de esta respuesta, un aumento exacerbado de citocinas y mediadores inflamatorios puede producir una situación patológica, tal y como ocurre en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas (Szabo et al., 2007), lo que hace que el sistema este finamente regulado (Akira and Takeda, 2004b).

Numerosos trabajos han demostrado que el consumo de alcohol suprime la respuesta del sistema inmunitario innato e incrementa el riesgo de padecer infecciones (Boe et al., 2003; Goral and Kovacs, 2005; Quinton et al., 2005; Szabo, 1999; Szabo and Mandrekar, 2009). De hecho, el tratamiento agudo de alcohol disminuye la activación de la vía de señalización de los receptores TLR en macrófagos humanos y de ratón, suprimiendo la activación de p38, ERK, NF- $\kappa$ B e inhibiendo la producción de citocinas (Goral and Kovacs, 2005; Mandrekar et al., 2002; Pruett et al., 2004c). El etanol también inhibe la activación de los receptores TLR4 y TLR3, afectando a los mecanismos de defensa de los macrófagos frente a diversos microorganismos (Dai et al., 2005; Pruett et al., 2004a). Sin embargo, algunas evidencias indican que el consumo crónico de alcohol genera un proceso inflamatorio en el hígado, que se asocia con un aumento de citocinas proinflamatorias en plasma (Auguet et al., 2008; Khoruts et al.,

1991), contribuyendo a la patogénesis de la hepatopatía alcohólica (Gonzalez-Quintela et al., 2007).

Algunos autores han sugerido que el receptor TLR4 desempeña un papel esencial en el proceso inflamatorio y en el daño que induce el alcohol en el hígado (Mandrekar and Szabo, 2009; Uesugi et al., 2001), ya que la carencia de este receptor elimina sus efectos dañinos en este órgano. Además, el consumo crónico aumenta la expresión de los receptores TLR4 en las células de Kupffer (Zuo et al., 2003), así como los niveles de RNA mensajero de prácticamente todos los miembros de esta familia (TLR 1, 2, 4, 6, 7, 8 y 9) (Gustot et al., 2006). De acuerdo con estos hallazgos, datos de nuestro laboratorio demuestran que el consumo prolongado de alcohol en la rata aumenta los niveles de citocinas plasmáticas e induce procesos inflamatorios en hígado y en cerebro, activando la respuesta innata inmunitario y las cascadas de señalización asociadas a la activación de los receptores TLR4 /IL-1RI (Valles et al., 2003; Valles et al., 2004).

En resumen, los datos de los que se dispone hasta el momento parecen indicar que el etanol, puede inhibir o promover la respuesta innata inmunitario iniciando un proceso inflamatorio. Con el objeto de clarificar esta controversia y analizar los mecanismos moduladores del etanol sobre el sistema inmunitario innato, en este trabajo hemos utilizado varias aproximaciones experimentales, incluyendo la utilización de macrófagos de ratón RAW 264.7 y macrófagos peritoneales tratados con dosis agudas y crónicas de etanol.

Resultados previos de otros laboratorios habían demostrado que el etanol inhibe la activación del receptor TLR4 producida por el LPS (Dai and Pruett, 2006b; Dai et al., 2005; Goral and Kovacs, 2005), e incluso inhibe la activación de los receptores TLR2, TLR3 o TLR9 producida por sus agonistas específicos (Goral and Kovacs, 2005; Pruett et al., 2004a). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran que el etanol es capaz de mitigar la respuesta generada por el LPS, reduciendo la

producción de TNF- $\alpha$  y disminuyendo la translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B en las células RAW 264.7. Sin embargo, nuestros resultados también demuestran que el etanol, a bajas dosis y en ausencia de otros ligandos de los receptores TLR, es capaz de inducir un cambio morfológico de los macrófagos característico de la activación de este tipo celular. Estas alteraciones en la morfología asociada a un estado activado se relacionan con un aumento en la liberación de mediadores inflamatorios. De hecho, demostramos que, mientras altas concentraciones de etanol no son capaces de estimular a los macrófagos y como consecuencia liberar citocinas al medio, concentraciones bajas o moderadas de etanol (10 mM y 50 mM) estimulan la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 y NO, aumentan la expresión de iNOS y COX-2 y activan las cascadas de señalización asociadas al receptor TLR4, a través de las vías de las MAPK y de NF- $\kappa$ B. Así, tras una estimulación con dosis moderadas de etanol observamos una rápida fosforilación de las quinasas ERK, JNK y p38 a los 10 min, así como una translocación al núcleo de la subunidad de NF- $\kappa$ B p65 a los 30 min. Estos resultados apoyan la idea de que el etanol, a concentraciones moderadas, es capaz de activar al receptor TLR4. En línea con esta hipótesis, el bloqueo del receptor TLR4 con un anticuerpo específico, reduce significativamente la producción de TNF- $\alpha$  inducida tanto por el etanol como por LPS (ligando específico de este receptor). Igualmente, nuestros resultados *in vivo* indican que una dosis de etanol induce una estimulación de los macrófagos peritoneales aumentando la producción de TNF- $\alpha$  y de NO en la cavidad peritoneal de ratones con TLR4<sup>+/+</sup>, pero esta estimulación no se observa en animales TLR4<sup>-/-</sup>, apoyando la idea de la participación de los receptores TLR4 en estos efectos.

En resumen, nuestros resultados podrían explicar las diferentes acciones que se han descrito para el etanol en la respuesta inmunitaria innata en macrófagos. A dosis bajas o moderadas, el etanol inicia un proceso inflamatorio a través de la activación de la vía de señalización asociada al receptor TLR4, mientras que dosis elevadas no son capaces de estimular esta cascada e incluso pueden bloquear su respuesta. Nuestros

datos también demuestran que el etanol suprime la activación producida por otros ligandos propios del receptor, lo que explicaría el mayor riesgo a padecer infecciones observado en alcohólicos (Szabo, 1999).

Referente a los posibles efectos del consumo crónico de alcohol en la inmunidad innata, no observamos cambios significativos en los niveles de TNF- $\alpha$ , NO ni de IL-10 en el lavado peritoneal de ratones sometidos a un consumo crónico de alcohol (10 % de alcohol en el agua de bebida) durante 5 meses (datos no mostrados), sugiriendo que durante el tratamiento prolongado se producen cambios adaptativos en la respuesta inmunitaria innata. De acuerdo con nuestros resultados, otros autores tampoco observan cambios en los niveles de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10 en el lavado peritoneal de ratones con un consumo del 20% de etanol en el agua de bebida durante 4 semanas, mientras que tras un tratamiento agudo, los mismos autores sí observan un aumento en los niveles de estas citocinas en la cavidad peritoneal (Dai and Pruett, 2006a). Estos resultados sugieren que, al contrario de lo que ocurre con dosis agudas de etanol, el consumo crónico no parece activar la inmunidad innata en macrófagos peritoneales.

Aunque los mecanismos de adaptación de la respuesta inmunitaria innata se desconocen, es probable que en estos efectos estén involucradas adaptaciones en los microdominios de membrana, *lipid rafts*. Como comentaremos más adelante (apartado 5.4 de la discusión), estos microdominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos juegan un papel esencial en la activación de los receptores TLR4 por el etanol (Triantafilou and Triantafilou, 2005). Concentraciones bajas de etanol, de forma aguda, podrían activar la inmunidad innata a través de la interacción del receptor TLR4 con los microdominios *lipid rafts*, mientras que el consumo prolongado puede causar adaptaciones en la composición lipídica de la membrana aumentando su rigidez (Peters and Preedy, 1998), podría afectar a la activación y reclutamiento de este receptor (Ver revisión de Blanco and Guerri, 2007), lo que explicaría la ausencia de los efectos del etanol sobre la respuesta inmunitaria innata.

### 5.1.2. Acciones del etanol sobre la respuesta adaptativa

Los receptores tipo Toll participan de la respuesta inmunitaria innata. Sin embargo algunas evidencias indican su papel en el inicio y regulación de la respuesta adaptativa.

Las células presentadoras de antígenos, como macrófagos, procesan los antígenos y los presentan a través de las moléculas MHC a los linfocitos. Para una eficiente y adecuada respuesta inmunitaria adaptativa es necesario que exista una detección efectiva del patógeno y la presentación de los antígenos en la superficie celular. Por ejemplo, niveles bajos o inapropiados de citocinas pro-inflamatorias pueden evitar el reclutamiento linfocitario en el lugar en donde se produce la invasión microbiana (Goral et al., 2008).

Como se comentó anteriormente, el etanol es un supresor del sistema inmunitario. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que este compuesto es capaz de generar un proceso inflamatorio. Es por ello por lo que nos planteamos el estudio de los efectos del etanol sobre algunas moléculas que participan en la inmunidad adquirida, analizando la capacidad de presentación antigénica de los macrófagos de ratones TLR4<sup>+/+</sup> y TLR4<sup>-/-</sup>. Nuestros resultados demuestran que el etanol actúa de forma similar al LPS, aumentando el número de células que expresan las moléculas MHC de clase I y de clase II en los ratones TLR4<sup>+/+</sup>, mientras que estos efectos no se producen en los ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Estos resultados sugieren que el etanol no sólo activa a los macrófagos a través de este receptor, sino que este receptor podría jugar un papel fundamental en los efectos que el alcohol ejerce sobre la inmunidad adaptativa.

Trabajos anteriores realizados en monocitos de humanos o de ratón tratados con etanol *in vitro*, demuestran que dosis agudas de etanol en presencia de superantígenos disminuyen la presentación antigénica y la proliferación de linfocitos T (Szabo et al., 2004; Szabo et al., 1995). Aunque estos datos parecen contradecir nuestros resultados, hay que destacar que los niveles de las moléculas de MHC no se analizaron en los monocitos

humanos y el uso de superantígenos puede modificar los resultados encontrados.

Nuestros resultados también indican que el tratamiento con LPS o con etanol modula de forma diferente la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Así, mientras el LPS provoca el aumento únicamente del número de células que expresan CD80 en ratones TLR4<sup>+/+</sup>, el etanol produce un descenso significativo en la intensidad de fluorescencia del CD86 en estos mismos ratones. Sin embargo, el tratamiento tanto con LPS como con etanol no ocasionan cambios significativos en la expresión de estas moléculas en los macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup>, datos que podrían estar relacionados con el hecho de que CD80 y CD86 aumentan su expresión al estimular este receptor (Arimilli et al., 2007).

La regulación de CD80 y CD86 es compleja y depende de diversos factores. Por ejemplo, la interacción con el receptor de células B o la unión de CD40/CD40L aumentan la expresión de ambas. Así mismo, ciertas citocinas regulan la expresión de estas moléculas. Por ejemplo, la IL-4 ejerce un papel inductor del CD86 y en menor medida de CD80, la IL-10 bloquea su expresión, mientras que las acciones del IFN $\gamma$  dependen del tipo celular (Lenschow et al., 1996). Nuestros resultados muestran un descenso en la expresión del CD86 en macrófagos procedentes de ratones tratados con etanol. Este descenso podría estar relacionado con un aumento de la citocina anti-inflamatoria IL-10 en la cavidad peritoneal, ya que otros trabajos han demostrado que el etanol reduce la expresión de CD40, CD80 y CD86 en células dendríticas, y estos descensos han sido relacionados con incrementos en la secreción de IL-10 (Lau et al., 2006).

Por otra parte, se ha sugerido que mientras el CD86 podría actuar en el inicio de la respuesta inmunitaria, el CD80 amplificaría y regularía dicha respuesta (Najafian and Khoury, 2003). Por tanto, es posible proponer que, aunque el etanol aumente la expresión de las moléculas MHC-I y II, la regulación negativa producida en CD86 sería la causante de que estos macrófagos no fueran capaces de activar a los linfocitos T y

producir su proliferación, tal y como se ha sugerido en algunos trabajos (Szabo et al., 2004) (Lau et al., 2006).

Los efectos del etanol sobre el sistema inmunitario son complejos y parecen depender, entre varios factores, de la dosis administrada, patrón de consumo y posible daño hepático (Goral et al., 2008). De hecho, nuestros resultados demuestran que, mientras que el tratamiento agudo de etanol activa la inmunidad innata y la adquirida, como se demuestra por el aumento en los niveles de las moléculas MHC-I y II, el consumo crónico no parece afectar a la inmunidad innata en los macrófagos peritoneales, pero sí modula la inmunidad adquirida. Hemos observado que el consumo de etanol al 10% en la bebida durante 2 y 4 semanas, no afecta los niveles de expresión de las moléculas MHC-I y II, pero el consumo prolongado de 5 meses disminuye significativamente la expresión de estas moléculas. Esta disminución en la respuesta adaptativa posiblemente esté relacionada con la presencia de daño hepático en los animales. De hecho, en pacientes con consumo crónico de etanol, pero sin hepatopatía alcohólica severa, no se producen cambios en los niveles de linfocitos en sangre periférica, ni en los niveles de células B, a pesar de tener elevado el nivel de inmunoglobulinas en suero. Sin embargo, en alcohólicos con hepatopatía alcohólica, se observa linfopenia y un descenso en el número de células B (Cook, 1998; Cook et al., 1996). El mismo fenómeno ocurre cuando se analizan las células NK. En pacientes con abuso de alcohol, pero sin hepatopatía alcohólica la actividad y el número de las células NK es normal, mientras que en alcohólicos con esta patología, se producen reducciones en el número de células NK y existe una pérdida de su actividad (Cook et al., 1997). Igualmente, el consumo crónico de alcohol también induce un descenso en la capacidad aloestimuladora de células dendríticas procedentes de pacientes con hepatitis C. Este efecto se ha asociado con un aumento en los niveles de la citocina anti-inflamatoria IL-10, reducción en los niveles de las citocinas IL-12 e IL-2 y de la proliferación de linfocitos T (Dolganiuc et al., 2003; Szabo et al., 2004). Esta disminución en la

proliferación y respuesta de los linfocitos T podría ser explicada por la reducción en la expresión de las moléculas MHC de clase I y II en los macrófagos de animales alcohólicos de 5 meses observada en este trabajo.

Algunos trabajos experimentales no encuentran cambios significativos en la inmunidad adaptativa tras un consumo crónico de etanol. Así, el tratamiento de etanol (20% en el agua de bebida) durante 8 a 32 semanas en ratones C56BL/6, no causa cambios en los niveles de inmunoglobulinas en suero, excepto un aumento en IgE (Cook et al., 2007). Aumentos en los niveles de IgE se han relacionado con procesos autoinmunes en alcohólicos, tal y como se ha demostrado por la presencia de auto-anticuerpos circulantes contra linfocitos, DNA, lipoproteínas séricas y varias proteínas hepáticas (Vidali et al., 2008).

Finalmente, ciertos trabajos indican que el consumo crónico de etanol pueden potenciar la inmunidad adaptativa (ver rev Lau et al., 2006). Se han descrito aumentos en los niveles de inmunoglobulinas en suero de alcohólicos (Gonzalez-Quintela et al., 2008) y en suero de ratones alcoholizados (Cook et al., 2007) así como en la activación de linfocitos T tanto en modelos animales (Cook et al., 2004; Song et al., 2002) como en humanos (Cook et al., 1995). Sin embargo, un aumento en la inmunidad adaptativa en alcohólicos no explicaría las diferentes evidencias clínicas que indican que el consumo de alcohol aumenta el riesgo a padecer infecciones y potencia los daños que éstas ocasionan (Szabo, 1999). En animales experimentales también se ha demostrado que la administración de alcohol de forma crónica aumenta la morbilidad, mortalidad y el daño tisular causado por una infección del virus de la influenza de ratón y estos efectos parecen estar asociados a una disminución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y a una disminución en la liberación de IFN- $\gamma$  (Meyerholz et al., 2008). Este descenso en la secreción de IFN- $\gamma$ , también se ha observado en cultivos mixtos de linfocitos T con células dendríticas procedentes de ratones alcoholizados y estimulados con ovoalbúmina (Heinz and Waltenbaugh, 2007), sugiriendo una disminución en la eficiencia con la que la célula

presentadora de antígenos activa a estos linfocitos o una reducción en la proliferación de estas células (Lau et al., 2006).

De todos estos datos de la literatura se podría concluir que los mecanismos por los que el etanol modula la respuesta innata y adaptativa son complejos, por lo que es difícil establecer una relación causa-efecto entre ellos. Nuestros resultados demuestran el papel de los receptores TLR4 en la activación que induce el etanol sobre la inmunidad innata y adquirida tras el tratamiento agudo, e indican que aunque el consumo crónico no parece afectar a la inmunidad innata en los macrófagos peritoneales, sí modula la respuesta adquirida.

## **5.2. EL ETANOL ACTIVA A LA MICROGLIA Y CAUSA APOPTOSIS DE LAS NEURONAS**

La microglía es la principal célula efectora inmune en el sistema nervioso central. Son células pequeñas con prolongaciones cortas e irregulares que tienen capacidad fagocitaria. Se originan a partir de precursores de la médula ósea y alcanzan el sistema nervioso a través de la sangre representando el sistema mononuclear fagocítico en el sistema nervioso. Al igual que los macrófagos, estas células tienen la capacidad de activarse rápidamente ante cualquier patógeno bacteriano o viral, iniciando un proceso de secreción de compuestos neurotóxicos, como especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico o citocinas inflamatorias, que pueden dañar a las neuronas y a la matriz extracelular y contribuir al daño neuronal observado en diversas enfermedades neurodegenerativas (Bjorkqvist et al., 2008; Block et al., 2007; Hanisch and Kettenmann, 2007; Jin et al., 2008). De hecho, algunos autores han sugerido su papel fundamental en el proceso inflamatorio asociado a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, demencia asociada al SIDA o esclerosis múltiple (Block et al., 2007; Gonzalez-Scarano and Baltuch, 1999). Muchas de estas enfermedades se caracterizan por una inflamación local en el cerebro y por una infiltración de leucocitos de la periferia. Estos leucocitos no producen neurotoxicidad, por lo que la respuesta de células gliales parece estar implicada. La activación de la microglía causada por toxinas, proteínas endógenas o daño neuronal provoca la secreción de factores tóxicos que propagan este daño. Esta activación no regulada de la microglía se ha relacionado con el inicio y progresión de enfermedades neurodegenerativas (ver revisión de Block and Hong, 2005).

El consumo y abuso de alcohol se ha asociado con daño cerebral y, en algunos casos, neurodegeneración (Pfefferbaum, 2004). Recientemente nuestro grupo ha propuesto que el etanol promueve procesos inflamatorios que pueden contribuir al daño cerebral que induce el

alcohol (Blanco and Guerri, 2007). Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que el consumo crónico de etanol activa la vía asociada al los receptores IL-1RI/TLR4 en el cerebro y en astrocitos, induciendo un aumento en el nivel de TNF- $\alpha$  así como de otros mediadores inflamatorios que podrían ser los causantes del daño neural (Valles et al., 2004). De acuerdo con la hipótesis de que el etanol genera un proceso inflamatorio en cerebro, algunos trabajos demuestran que el consumo de alcohol aumenta las citocinas pro-inflamatorias en cerebros de alcohólicos (He and Crews, 2008) y en ratones tratados con etanol intraperitonealmente (Qin et al., 2008). El TNF- $\alpha$  es una de las citocinas que se incrementa en cerebros de animales tratados con etanol (Crews et al., 2006) y participa en el daño neuronal y en la patogénesis de diversas enfermedades (McCoy and Tansey, 2008). Sin embargo, a pesar de la importancia de la microglía en la neuroinflamación, el papel de estas células gliales en estos procesos y su participación en el daño cerebral que induce el etanol no ha sido abordado hasta el inicio de este trabajo.

Los resultados del presente trabajo demuestran claramente que el etanol, a dosis agudas, es capaz de activar a la microglía e iniciar un proceso inflamatorio a través de la vía de señalización asociada al receptor TLR4. Así, demostramos por primera vez que el etanol: 1) modifica la morfología de la microglía haciendo que estas células adquirieran un fenotipo activado, 2) aumenta su capacidad fagocítica, 3) induce la vía de las MAPK, aumentando la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38, 4) activa al factor de transcripción NF- $\kappa$ B, 5) induce un aumento en la secreción de citocinas y mediadores inflamatorios como iNOS y COX2.

Sin embargo, la activación de la microglía tiene un papel dual. Por una parte, desempeña funciones esenciales para la supervivencia neuronal, participando en la respuesta inmunitaria innata y en el mantenimiento celular mediante la eliminación de compuestos tóxicos celulares (Block and Hong, 2005). Pero, por otra parte, la microglía activada puede ser neurotóxica ya que la secreción de especies reactivas de oxígeno, NO o TNF- $\alpha$  pueden dañar a las neuronas, oligodendriocitos o matriz extracelular

(Hanisch and Kettenmann, 2007). Además, la activación de la microglía parece inducir una amplificación en su respuesta, ya que los restos celulares causados por la muerte neuronal son capaces de activar nuevamente a la microglía, aumentando su respuesta inflamatoria (Griffin, 2006). De hecho, la activación de la microglía induce neurodegeneración tanto *in vitro* como *in vivo* (Liu et al., 2000; Liu and Hong, 2003). De acuerdo con estos datos, nuestros resultados demuestran que una activación de la microglía inducida por el etanol puede causar muerte neuronal y posible neurodegeneración. De hecho, demostramos que el medio condicionado procedente de microglía activada por etanol induce la apoptosis de neuronas en cultivo, sugiriendo que la activación de la microglía podría promover un proceso inflamatorio en cerebro, causar muerte neuronal y contribuir al daño cerebral que se observa en alcohólicos (Harper and Matsumoto, 2005).

### 5.3. EL ETANOL ACTIVA A LA MICROGLÍA A TRAVÉS DE LOS RECEPTORES TLR4

La activación de la microglía tiene lugar a través de diferentes receptores, incluyendo los receptores tipo Toll. Estos receptores se activan por agentes patógenos y restos celulares, principalmente en las células gliales (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) y en los leucocitos que se infiltran en respuesta a un proceso inflamatorio. Datos de los últimos años han demostrado que los receptores tipo Toll, además de participar en la plasticidad neuronal, regulando procesos de neurogénesis y de crecimiento de neuritas, están involucrados en el daño neuronal generado por isquemia o por esclerosis múltiple (Carpentier et al., 2008; Okun et al., 2009). Así, la estimulación de los receptores TLR en astrocitos y microglía induce un aumento en los niveles de iNOS (Carpentier et al., 2005; Olson and Miller, 2004). Además, se ha observado que la activación del receptor TLR4 en microglía participa en el daño de los oligodendrocitos (Lehnardt et al., 2002), neurodegeneración (Lehnardt et al., 2003) y apoptosis de las propias células microgliales (Jung et al., 2005; Liu and Hong, 2003). Finalmente, los receptores Toll han sido involucrados en el daño cerebral y procesos neurodegenerativos (Campbell, 2004).

El alcohol es un neurotóxico cuyo abuso causa daño cerebral (de la Monte, 1988; Harper and Matsumoto, 2005). Aunque hasta el momento, los procesos neuropatológicos de la toxicidad del etanol no han sido esclarecidos, datos previos de nuestro laboratorio sugieren que el etanol induce daño neural por neuroinflamación (Valles et al., 2004). Los resultados obtenidos en células RAW 264.7 indican que el etanol promueve la liberación mediadores inflamatorios a través de la activación de los receptores TLR4, ya que cuando se bloquea este receptor con anticuerpos que lo neutralizan, se reduce la liberación de TNF- $\alpha$  y el aumento en la expresión de COX-2. Además, la activación de este receptor ha sido involucrada con el desarrollo de la hepatopatía alcohólica. La deficiencia en

la función del receptor TLR4 en ratones, elimina los aumentos provocados por el etanol en los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , especies reactivas de oxígeno y del citocromo P450 y protege contra la hepatopatía alcohólica experimental (Hritz et al., 2008; Uesugi et al., 2001). En estos estudios se sugiere que el receptor TLR4 participa en estos procesos debido a un aumento en los niveles de LPS en hígado, causado por el incremento de las bacterias intestinales al aumentar la permeabilidad intestinal al LPS derivado de un consumo prologado de alcohol (Wheeler, 2003).

Los resultados del presente estudio demuestran que el etanol, al igual que el LPS, es capaz activar la vía de señalización asociada al receptor TLR4 en macrófagos y en microglía. De hecho, nuestros resultados demuestran, por primera vez, que el etanol activa a microglía tanto de rata como de ratón y este proceso tiene lugar a través del receptor TLR4 (Fernandez-Lizarbe et al., 2009).

La activación de los receptores tipo Toll induce un reclutamiento de diversas proteínas adaptadoras hacia los dominios TIR (O'Neill, 2003; Takeda et al., 2003) en las que se incluyen MyD88, MAL/TIRAP, TRIF y TRAM. Estas proteínas adaptadoras inician dos vías de señalización diferentes. Por una parte, MyD88 y MAL, que intervienen en la vía MyD88-dependiente, activan IRAK y provocan una rápida estimulación de NF $\kappa$ B así como una activación de las MAPK y del factor nuclear AP-1. Por otra parte, TRAM y TRIF estimulan la respuesta de interferón activando al factor IRF-3 y genes inducibles por interferón (Toshchakov et al., 2002). Los resultados obtenidos en cultivo primario de microglía de rata indican que el etanol no sólo activa la cascada de señalización asociada clásicamente al receptor TLR4 (MAPK y NF $\kappa$ B), sino que también activa la vía MyD88-independiente, tal y como demostramos por la fosforilación de IRF3 así como por la activación de STAT-1 y de IRF1. En apoyo a la hipótesis de que el alcohol puede activar las dos vías de señalización (MyD88-dependiente, MyD88-independiente) asociadas a la respuesta del receptor TLR4, nuestros

resultados demuestran que, mientras que el etanol estimula estas vías en microglía procedente de ratones TLR4<sup>+/+</sup>, no las activa en microglía procedente de ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Referente a la participación de esta segunda vía en el daño que induce el etanol, en un reciente trabajo se demuestra que ratones deficientes en el receptor TLR4 protegen del daño, sin embargo en ratones deficientes en MyD88 no se elimina la inflamación y el daño inducido por el etanol en hígado. Estos datos apoyan la idea de que el etanol actúa a través del receptor TLR4 y sugieren que la activación de la vía MyD88-independiente desempeñaría un papel importante en la hepatopatía alcohólica (Hritz et al., 2008).

Considerando que tanto la microglía como el receptor TLR4 están implicados en la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas (Lehnardt et al., 2003), y nuestros resultados *in vitro* demuestran la participación de dicho receptor en la activación de la microglía inducida por el etanol y la muerte neuronal, estudiamos las posibles consecuencias de la administración *in vivo* de etanol. Nuestros resultados indican que dosis agudas de alcohol (4g/kg) inducen una activación de la microglía (células CD11b positivas) en corteza cerebral, y este proceso ocurre a través del receptor TLR4, ya que no se observa la microglía activada en *neocortex* de ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Estos hallazgos *in vivo* demuestran claramente la participación de los receptores TLR4 en la activación de la microglía inducida por el etanol. De acuerdo con nuestros resultados, trabajos recientes demuestran que la administración de etanol, tanto con dosis agudas como con un consumo continuado durante 10 días, inducen un aumento de citocinas proinflamatorias y provocan la activación de la microglía (Qin et al., 2008). Además, en un estudio reciente en humanos se ha observado un aumento en la expresión de MCP-1 y la activación de la microglía en diversas regiones del cerebro de alcohólicos (He and Crews, 2008). Estos resultados en humanos y en animales experimentales sugieren que el consumo de etanol puede causar neuroinflamación y que la activación de la microglía está implicada en este proceso. De hecho, datos

de nuestro laboratorio indican que dosis agudas de etanol, de forma intermitente, inducen la expresión de ciertos mediadores inflamatorios, como COX-2 e iNOS, que se asocia con un aumento de apoptosis en ciertas áreas de cerebro de ratas adolescentes (como por ejemplo la corteza prefrontal o cerebelo) (Pascual et al., 2007). Resultados obtenidos recientemente demuestran la participación de los receptores TLR4 en los anteriores eventos. De hecho, nuestros resultados indican que mientras el tratamiento crónico de alcohol activa a la microglía y a la astrogía, incrementa los mediadores inflamatorios en corteza cerebral y causa daño y muerte neuronal en ratones TLR4<sup>+/+</sup>, estas alteraciones no se producen TLR4<sup>-/-</sup> demostrando claramente la participación de estos receptores en la neuroinflamación y el daño cerebral inducido por el consumo de alcohol (Alonso y col., artículo en revisión).

En conclusión, nuestros datos revelan que el etanol actúa a través de los receptores TLR4 activando a la microglía, lo que podría contribuir al daño cerebral producido por su consumo.

## 5.4. MECANISMO DE ACTUACIÓN DEL ETANOL

### 5.4.1. Papel de los *lipid rafts* en la activación de la vía de señalización asociada al receptor TLR4 producida por el etanol

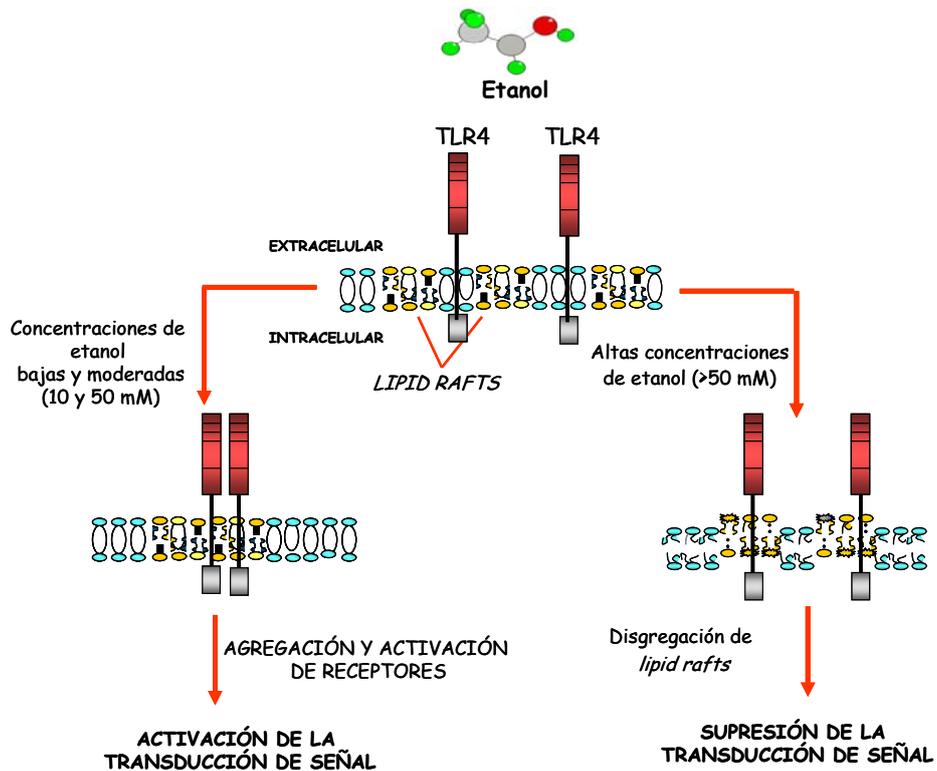
Los *lipid rafts* o *balsas lipídicas* son microdominios de membrana ricos en colesterol, glicolípidos y esfingolípidos, que ejercen un papel importante en la transducción de señales. Estos microdominios actúan como plataformas de señalización que sirven para ensamblar a los componentes requeridos, facilitando su interacción y señalización. Así, ciertos receptores, proteínas adaptadoras, enzimas efectoras y sustratos estarían colocalizados en un solo microdominio (Magee et al., 2002; Pike, 2003). El reclutamiento de estas proteínas provoca un cambio en el entorno donde el estado de fosforilación se puede modificar debido a la presencia de quinasas y fosfatasas locales y, en consecuencia, iniciar la transducción de la señal. Por ejemplo, se ha demostrado que estos microdominios actúan facilitando la señalización asociada a tirosina quinasas (Harder and Simons, 1999; Pike, 2003). K. Simons y D. Toomre, en su revisión del año 2000 (Simons and Toomre, 2000), ya recogen algunos ejemplos en los *rafts* podrían facilitar el inicio de diversas cascadas de transducción de señales. Entre ellos, podemos destacar las acciones de la inmunoglobulina E en un proceso alérgico, el reconocimiento antigénico mediante el receptor TCR en los linfocitos T o la cascada asociada a la GTPasa Ras en la que participa la activación de MAPK.

Los mecanismos por los que el etanol activa o inhibe al receptor TLR4, no están totalmente esclarecidos. Sin embargo, es razonable pensar que el etanol podría interactuar con estos receptores mediante uno de los siguientes mecanismos: 1) El etanol podría actuar como un ligando e interactuar con dominios específicos del receptor TLR4. De hecho, se ha descrito que ciertos compuestos endógenos (como restos celulares, proteínas de choque térmico, fibrinogeno) (Takeda et al., 2003) o exógenos (como el taxol) (Ding et al., 1990) podrían activar a los receptores TLR4. La

activación de estos receptores por ligandos inespecíficos sugiere que la interacción ligando/receptor no es ni muy específica ni directa con los componentes microbianos que reconoce. La unión LPS-TLR4, necesita la participación de otras proteínas adaptadoras, como el CD14, MD-2 y LBP, y la formación de este complejo le permitiría al receptor TLR4 reconocer diferentes estructuras microbianas. 2) La segunda posibilidad es que el etanol a través de sus interacciones con microdominios lipídicos de la membrana, pueda inducir dimerización y activación de los receptores TLR. De hecho, está establecido que el etanol interacciona con los lípidos de membrana cambiando la fluidez de la misma (Gutierrez-Ruiz et al., 1995). En apoyo a esta última hipótesis, evidencias recientes indican el papel de los microdominios de membrana ricos en colesterol/esfingomielina, *lipid rafts* en la respuesta inmunitaria innata (Triantafilou et al., 2002; Triantafilou and Triantafilou, 2005) y en la activación y señalización mediada por los receptores TLR4 (Olsson and Sundler, 2006).

Basándonos en que muchos de los efectos que ejerce el etanol sobre algunas proteínas de membrana están mediados por sus interacciones con los componentes lipídicos de la membrana, así como el papel de los *lipid rafts* en la activación de los receptores TLR4 (Triantafilou et al., 2002; Triantafilou and Triantafilou, 2005), hemos postulado que el etanol, dependiendo de su concentración y presencia o ausencia de los ligandos de los TLR, podría activar o inhibir la señalización mediada por este receptor mediante su interacción con los *lipid rafts* (Blanco and Guerri, 2007). Altas concentraciones de etanol podrían afectar a la estabilidad de los *lipid rafts* e inhibir el reclutamiento y señalización de los receptores TLR4, mientras que concentraciones bajas y moderadas, podría facilitar el reclutamiento de diversas proteínas a los *lipid rafts* y activar la ruta de señalización (ver esquema de la Figura 46). Cambios en la composición lipídica de la membrana, podrían afectar el reclutamiento y señalización de los receptores TLR4. De hecho, tratamientos crónicos de etanol, que aumentan los niveles de colesterol en la membrana plasmática

transformándola en una membrana más rígida, podrían provocar que el complejo del receptor no se disociara, pudiendo dar lugar a una señal más prolongada (Goral et al., 2008). Además, el etanol podría interferir en la señalización de los receptores TLR cuando los ligandos específicos están presentes como ocurre con el caso del LPS .



**Figura 46. Posible mecanismo de actuación del etanol sobre el receptor TLR4.** El etanol parece actuar a través de los *lipid rafts*. A concentraciones bajas favorecería el reclutamiento de los receptores TLR4/IL-1RI a estos microdominios, mientras que concentraciones de etanol altas producirían la disgregación de los *lipid rafts*.

Los datos obtenidos en células RAW 264.7 apoyan esta hipótesis, ya que por primera vez demostramos que, en macrófagos, el etanol, a concentraciones moderadas, se comporta como el LPS, promoviendo la translocación del receptor TLR4 y de moléculas implicadas en su

señalización (como IRAK, MyD88 y P-ERK), hacia *lipid rafts* ricos en flotilina-1. Hay que señalar que, aunque demostramos que el etanol activa a las MAPK (p38, JNK y ERK1/2) para el estudio de su asociación a *lipid rafts*, nos hemos centrado en la proteína ERK1/2, ya que esta quinasa también participa en mecanismos de supervivencia y protección frente a los efectos tóxicos producidos por altas concentraciones de etanol (Pascual et al., 2003; Villegas et al., 2006). De hecho, se ha propuesto que ERK actúa a través de los *lipid rafts* protegiendo frente al daño causado por especies reactivas de oxígeno provocadas durante eventos patológicos como isquemia e inflamación (Yang et al., 2006).

Por otra parte, nuestros resultados también muestran que altas concentraciones de etanol (200 mM) actúan de forma similar a los agentes que disgregan a los *lipid rafts* (saponina o estreptolisina-O), impidiendo la translocación del receptor TLR4 a estos microdominios de membrana y evitando su reclutamiento y posterior transducción de señales.

Datos que apoyan la hipótesis planteada son los hallazgos que muestran que el etanol suprime la activación del receptor TLR4 mediada por el LPS. En células CHO (ovario de hámster chino) se ha demostrado que el etanol que tiene un efecto supresor en el reclutamiento del receptor TLR4 a los *lipid rafts* (Dolganiuc et al., 2006). Por otra parte, se sabe que la unión del LPS-CD14 al TLR4 provoca un agrupamiento de este receptor, principalmente en membrana plasmática, y una reorganización de los filamentos de actina. En células RAW 264.7 estimuladas con LPS, el etanol parece actuar evitando este agrupamiento, interfiriendo en la localización del CD14, molécula residente de *lipid rafts*, y disminuyendo la producción de TNF- $\alpha$ . Este mismo efecto se ha observado con el tratamiento de agentes desestabilizantes de *lipid rafts* (Dai and Pruett, 2006b; Dai et al., 2005). Nuestros resultados parecen indicar que el CD14 está implicado en la señalización inducida por el alcohol como ocurre con la activación por el LPS. El tratamiento con dosis bajas o moderadas de etanol provoca un aumento en la expresión de esta proteína en fracciones ricas en flotilina-1

pudiendo producirse una asociación con el receptor TLR4 interviniendo en su activación.

Los resultados obtenidos en microglía en este trabajo muestran que el etanol provoca un cambio en la localización del receptor TLR4 y de moléculas asociadas a su vía de señalización (TRAF6 y MyD88), hacia las fracciones ricas en *lipid rafts* (fracciones resistentes a la lisis con Tritón X-100). Además, mediante microscopía confocal, demostramos que, tanto el tratamiento con LPS como con etanol 50 mM, inducen un aumento significativo en la colocalización del receptor TLR4 con la caveolina-1. Estos resultados sugieren que el mecanismo de actuación del etanol sobre el receptor TLR4 sería el mismo en microglía que en macrófagos, aunque se observan pequeñas diferencias en la reorganización del TLR4 en estos dos tipos celulares. Así, mientras que en los primeros el receptor se recluta a fracciones principalmente ricas en flotilina-1, en los segundos hemos observado, mediante los experimentos de microscopía confocal, que el movimiento se produce hacia dominios ricos en caveolina-1. Al tratar estas células durante 30 min con el ligando del receptor TLR4, el LPS, los resultados son los mismos que los obtenidos con etanol 50 mM, el receptor TLR4 se concentra en regiones ricas en caveolina-1 en el caso de la microglía y en regiones ricas en flotilina-1 en el caso de las células RAW 264.7.

La activación del receptor TLR4 por el LPS conlleva a la formación de agregados que le permiten iniciar la vía de señalización. Posteriormente, se produce la endocitosis del receptor, disminuyendo la cantidad del mismo en membrana plasmática y es transportado en forma de complejo LPS-TLR4 hacia el aparato de Golgi o hacia endosomas tempranos (Husebye et al., 2006; Latz et al., 2002). Los *lipid rafts* abundan en membrana plasmática, pero también se han encontrado en rutas biosintéticas y de endocitosis, así como en otras membranas intracelulares como el Golgi (Pike, 2003; Simons and Toomre, 2000). Además, existen estudios que relacionan estas estructuras con la transducción de señales. Se ha analizado el papel de los *lipid rafts* ricos en caveolina o *caveolas*, y su papel

en rutas endocíticas no dependientes de clatrina. En este caso, el receptor es endocitado por ciertas estructuras con pH neutro, o *caveosomas*, y que son distintas a los compartimentos clásicos endocíticos. Se ha demostrado que, al menos, existen dos rutas, una que pasa por el retículo endoplasmático, como ocurre en el caso de virus del simio 40 (SV40) y otra que se produce a través de endosomas tempranos acumulándose en el Golgi (Nichols, 2003; Pelkmans et al., 2004; Pelkmans et al., 2001). Otros estudios han demostrado que también existe una señalización a través de los *lipid rafts* ricos en flotilina-1. Así, se ha observado que la flotilina es clave para la activación de los mastocitos a través de la IgE (Kato et al., 2006). Incluso, a pesar de que la flotilina se ha asociado con la formación de *lipid rafts* planos que parecían no estar implicados en vías endocíticas, recientemente se ha implicado a esta familia de proteínas en la formación de vesículas. Se ha sugerido que la flotilina 1 y 2 pueden pasar de formar dominios planos a invaginaciones similares a caveolas. Estas invaginaciones no necesitan caveolina para su formación y se ha observado que se acumulan en el interior de la célula (Frick et al., 2007). Por tanto, el reclutamiento del receptor TLR4 en dominios ricos en flotilina-1, en el caso de los macrófagos, o en dominios ricos en caveolina-1, en el caso de la microglía, podría estar relacionado con la vía endocítica que sigue este receptor según el tipo celular.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo en células RAW 264.7 (Fernandez-Lizarbe et al., 2008) y en microglía, indican que a dosis bajas/moderadas, el etanol facilitaría el reclutamiento y señalización de los receptores TLR4 en los *lipid rafts*. Estos microdominios participarían en la internalización de dicho receptor y facilitarían la transducción de la señal.

#### **5.4.2. Papel del receptor TLR2 en la activación de las células microgliales por el etanol.**

La activación del receptor TLR4 promueve un reclutamiento de este receptor hacia los *lipid rafts*, fenómeno que también se observa en otros miembros de la familia TLR. En particular, la estimulación del receptor TLR2 con LTA, el peptidoglicano u otros componentes microbianos, induce un desplazamiento del receptor hacia fracciones donde se localizan los *lipid rafts*, observándose una disminución de su coeficiente de difusión lateral, producido por un desplazamiento del receptor hacia microdominios con una mayor organización de la membrana característica de los *lipid rafts*, en los que el movimiento del receptor está más limitado. Utilizando la técnica de FRET (transferencia de energía de resonancia) se ha observado que la estimulación de este receptor promueve una mayor co-localización del receptor TLR2 con el gangliósido GM1, marcador de *lipid rafts* (Triantafyllou et al., 2004) (Dolganiuc et al., 2006; Shin et al., 2008). Nuestros resultados de microscopía confocal concuerdan con los anteriores hallazgos, ya que observamos en microglía estimulada con LTA un aumento significativo en la expresión del receptor TLR2 y en su co-localización con la caveolina-1, mientras que el tratamiento con LPS no provoca estos aumentos.

El etanol afecta al reclutamiento que el LPS provoca del receptor TLR4, pero no parece afectar al movimiento que produce el péptidoglicano sobre el receptor TLR2 (Dolganiuc et al., 2006). A pesar de ello, hemos observado que el receptor TLR2 se comporta de la misma forma cuando es estimulado con su ligando LTA que tras el tratamiento con dosis moderadas de etanol. Nuestros resultados demuestran que el etanol provoca un aumento en la intensidad del receptor TLR2 y también aumenta el porcentaje de co-localización de dicho receptor con la caveolina-1. Además observamos que el tratamiento con etanol induce un aumento en la co-localización de los receptores TLR4 y TLR2. Se ha descrito que el receptor TLR2 puede asociarse con otros miembros de la familia TLR y esta asociación le permite reconocer un amplio espectro de componentes

microbianos. Así, el receptor TLR2 puede asociarse con el TLR1 y reconoce lipopéptidos triacilados, mientras que su asociación con el TLR6 hace que reconozca al LTA bacteriano y a lipopéptidos diacilados (Takeda and Akira, 2005). Nuestros datos sugieren que el etanol, al interactuar con los microdominios de membrana provoca el movimiento del TLR2 a *lipid rafts* ricos en caveolas, pudiendo actuar estos microdominios de plataforma para su interacción con el receptor TLR4 y posibilitar el inicio de sus cascadas de señalización.

Es importante resaltar que, resultados recientes demuestran que la activación del receptor TLR2 juega un papel crítico en la respuesta temprana de la glía al daño cerebral (Babcock et al., 2006; Lehnardt et al., 2007). Este receptor, junto con el TLR4, participa en la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento leucocitario que se produce tras un daño en el sistema nervioso central (Babcock et al., 2008). Incluso, se ha descrito que ambos receptores están presentes en neuronas y participan en el daño inducido en neuronas corticales en respuesta a la isquemia (Tang et al., 2007).

Algunos estudios demuestran que el etanol, como ocurre en el caso del receptor TLR4, reduce la respuesta del TLR2 a sus ligandos en macrófagos (Goral and Kovacs, 2005; Pruett et al., 2004c) y la deficiencia en TLR2 no afecta a las consecuencias que producen el consumo de etanol en el hígado (Hritz et al., 2008). Estos datos sugieren que, aunque el receptor TLR2 puede potenciar ciertas acciones del etanol, como la respuesta de la microglía, no parece desempeñar un papel crítico en las acciones del etanol sobre el sistema inmunitario innato.

En células RAW 264.7 hemos observado que el etanol provoca el reclutamiento a los *lipid rafts* del receptor TLR4, pero también de IL-1RI. Datos previos de nuestro laboratorio han demostrado que, en astrocitos, el etanol actúa sobre estos dos receptores. El bloqueo de cualquiera de ellos, TLR4 o IL-1RI, reduce la activación que el etanol produce sobre el aumento

de mediadores inflamatorios (Blanco et al., 2008; Blanco et al., 2005). Al analizar estos resultados con los obtenidos en microglía podemos observar distintos efectos del etanol dependiendo del tipo celular. El etanol podría generar un proceso inflamatorio a través de la activación de la cascada de señalización asociada al receptor TLR4, promoviendo la asociación a los *lipid rafts* de otros receptores, como IL-1RI en astrocitos y en células RAW 264.7, o el receptor TLR2 en microglía. En astrocitos el etanol podría actuar a través de los dos receptores TLR4 e IL-1RI, como reflejan los resultados que demuestran que bloqueando individualmente a estos receptores se elimina la función de ambos. Sin embargo, en microglía y en macrófagos, a pesar de producir una activación del receptor TLR2 en microglía, es necesario que el receptor TLR4 esté presente para ejercer sus acciones, como observamos en los resultados con ratones TLR4<sup>-/-</sup>. Estos datos nos hacen sugerir que el mecanismo modulador de las acciones del etanol sobre el sistema inmunitario innato es principalmente a través de sus acciones sobre los *lipid rafts*.

#### **5.4.3. Posible papel de los *lipid rafts* en las acciones del etanol sobre la inmunidad adquirida**

Los resultados del presente trabajo demuestran que el etanol no sólo activa la respuesta inmunitaria innata, si no que también modifica la respuesta inmunitaria adaptativa. De hecho, observamos que el etanol es capaz de modular la expresión de las moléculas MHC de clase I y II, y estos efectos están mediados por los receptores TLR4 (como demuestran los resultados obtenidos en macrófagos procedentes de ratones TLR4<sup>-/-</sup>) y por los *lipid rafts*.

Los *lipid rafts* parece que facilitan la presentación antigénica promoviendo una mayor concentración del complejo MHC-II-péptido. Aproximadamente la mitad de las moléculas MHC-II se localizan en estos microdominios en las células B y en macrófagos (Anderson et al., 2000; Poloso and Roche, 2004), lo que corrobora nuestros resultados obtenidos en macrófagos peritoneales. A pesar de que existen varios trabajos que

analizan la interacción de las moléculas MHC-II con los *lipid rafts*, no existen datos de las posibles interacciones entre las moléculas MHC-I y los *rafts*.

Nuestros resultados muestran que ambas moléculas están presentes en los *rafts* tipo caveola (en torno al 50% en situación control). Además, hemos demostrado que el etanol, con la participación del receptor TLR4, induce la expresión de las moléculas MHC clase I y II y promueve su asociación con los *rafts* tipo caveola. Varias hipótesis han tratado de explicar el papel de los *rafts* en la activación de las moléculas MHC-II. Entre ellas, merecen ser destacadas en relación a este trabajo: a) favorecen la transducción de señales, b) participan en el transporte intracelular de las moléculas MHC hacia la membrana (Goebel et al., 2002), c) posibilitan la aproximación física de complejos MHC con distintos péptidos (Poloso et al., 2004), d) aumentan la densidad del péptido que se presenta en una región determinada y así posibilitan la activación de los linfocitos T (Anderson et al., 2000).

Las acciones del etanol sobre los *lipid rafts* no sólo afectan a la localización de algunos miembros de la familia TLR, sino que afectan a otras moléculas como los MHC. Estos datos sugieren que gran parte de la diversidad de efectos que induce el etanol en el sistema adaptativo, posiblemente estén mediados por sus interacciones con microdominios de la membrana que podrían modular la respuesta adquirida o incluso podrían explicar algunos de los efectos que ejerce el etanol sobre otros receptores en el sistema nervioso central. Por ejemplo, se sabe que el consumo de etanol modula la actividad del receptor NMDA siendo uno de los mecanismos de la neurotoxicidad inducida por el alcohol. Recientemente se ha observado que este receptor está localizado en los *lipid rafts* y que fármacos que inhiben la síntesis de colesterol previenen el daño cerebral que ocasiona su sobreactivación (Besshoh et al., 2005; Ponce et al., 2008). Los efectos moduladores del etanol sobre la actividad de este receptor podrían ejercerse a través de estos microdominios de membrana. En resumen, proponemos que la interacción del etanol con microdominios

lipídicos podría ser uno de los mecanismos generales de las acciones de etanol sobre el sistema inmunitario, tanto el innato como el adaptativo.

#### **5.4.4. El etanol induce cambios epigenéticos en células microgliales**

Los mecanismos epigenéticos son procesos en los que se modifica la expresión génica sin alteración del código genético a través de modificaciones covalentes del DNA o de las histonas. Dependiendo de la naturaleza de las modificaciones, pueden aumentar o disminuir la transcripción. Así, la acetilación y fosforilación de histonas hacen que el DNA sea más accesible favoreciendo la transcripción, mientras que la metilación del DNA se asocia con el silenciamiento génico aumentando la condensación de cromatina (Graff and Mansuy, 2009; Kouzarides, 2007).

Estudios de los últimos años han demostrado que los inhibidores farmacológicos de histona deacetilasas actúan aumentando la transcripción de genes implicados en neuroprotección. Por ejemplo, el uso de estos inhibidores tras la isquemia, aumentan la expresión de proteínas neuroprotectoras como Hsp70 o Bcl-2 (Faraco et al., 2006). Algunos de estos fármacos reducen la inflamación, previenen la desmielinización y la pérdida neuronal y axonal a través de la modulación de la expresión génica e inhiben la activación de las rutas pro-apoptóticas P-AKT y p53. Además, estos fármacos reducen la zona infartada del cerebro tras el daño, suprimiendo la activación de la microglía y bloqueando la inducción de iNOS y COX-2. La neuroprotección asociada a los inhibidores de histonas deacetilasas tras la isquemia cerebral parece suprimir el proceso inflamatorio (Kazantsev and Thompson, 2008; Kim et al., 2007a). Los inhibidores de las histona deacetilasas evitan la hipoacetilación que se produce tras el daño y así ejercen sus funciones protectoras. Pero por otra parte, los procesos inflamatorios se han asociado con un incremento de la acetilación de histonas, debido al aumento en la transcripción de genes que codifican para mediadores inflamatorios. Compuestos con propiedades anti-

inflamatorias, como los corticosteroides o teofilina, actúan, en parte, aumentando el reclutamiento de las histonas deacetilasas para reducir esta acetilación e inhibir la expresión de estos genes proinflamatorios (Ito et al., 2002). Sin embargo, un aumento en la actividad de las histonas acetiltransferasas, activa a los factores de transcripción NFκB así como AP-1, facilitando e incrementando la secreción de mediadores inflamatorios (Rahman, 2002).

Existe una relación entre desregulación epigenética y patologías neurodegenerativas como por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o de Huntington en las que se ha observado una modificación en la acetilación y metilación de histonas (Graff and Mansuy, 2009; Kazantsev and Thompson, 2008).

El consumo de etanol genera neuroinflamación y neurodegeneración por lo que nos planteamos estudiar sus efectos en la acetilación de las histonas H3 y H4. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con dosis moderadas de etanol induce aumentos en la acetilación de las histonas H3 y H4 en células microgliales y estos eventos dependen de la funcionalidad del receptor TLR4. Estos hallazgos sugieren que el etanol causaría cambios en la acetilación de histonas que estarían mediados por la activación del receptor TLR4. De hecho existen datos que relacionan modificaciones epigenéticas con las adaptaciones que se originan tras un tratamiento con LPS (Foster et al., 2007). Además, se ha observado que los fármacos empleados como inhibidores de las histona deacetilasas potencian el efecto del LPS, debido a que generan hiperacetilación aumentando la transcripción de genes que participan en procesos inflamatorios en los que la microglía está implicada. (Suuronen et al., 2006; Suuronen et al., 2003). Nuestros resultados sugieren que el proceso inflamatorio generado por el etanol en microglía podría inducir modificaciones epigenéticas aumentando la acetilación de histonas.

### 5.6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados del presente trabajo indican que el etanol es capaz de modular la respuesta inmunitaria innata y adquirida, activando a los receptores TLR4 en las células microgliales y macrófagos y generando un proceso inflamatorio. El mecanismo por el que el etanol ejerce sus acciones está principalmente mediado por sus interacciones con los lípidos de membrana, en particular con los microdominios *lipid rafts*. Sería interesante evaluar los efectos del etanol en células de animales deficientes para la caveolina 1 y 2, y de animales deficientes de los receptores IL-1R1 y TLR2, para poder valorar el papel de estas proteínas en las acciones del etanol sobre el sistema inmunitario. Al mismo tiempo la eliminación de MyD88 nos permitiría analizar cuál de las dos vías asociadas a la activación del receptor TLR4 es responsable del daño inducido por el etanol en cerebro.

Nuestros resultados también indican que el etanol, a través de la activación de la microglía y de los receptores TLR4 podría causar neuroinflamación y daño neuronal. Una activación de la microglía a través del TLR4 se ha relacionado con pérdida axonal (Lehnardt et al., 2003), con alteraciones en la oligodendroglía (Lehnardt et al., 2002) y con niveles elevados de citocinas proinflamatorias que se han relacionado con procesos de desmielinización (Probert and Akassoglou, 2001). Por tanto, sería de interés evaluar si el consumo agudo o crónico de alcohol en animales experimentales conlleva, junto con una activación de la glía y daño neuronal, a una reducción o alteraciones en la mielina. De hecho, estudios de neuroimagen demuestran importantes reducciones en la materia blanca y pérdida de mielina en cerebros de alcohólicos (Harper and Matsumoto, 2005). Por tanto, sería interesante realizar estudios enfocados a determinar los efectos del etanol sobre la oligodendroglía y el posible papel del receptor TLR4 en estos procesos.

Finalmente, resultados preliminares sugieren que el etanol genera modificaciones epigenéticas a través del receptor TLR4. Una línea de investigación potencial es el estudio de los genes implicados mediante la técnica de inmunoprecipitación de cromatina. Con esta técnica se puede

evaluar la posible actividad de los factores de transcripción que se afectan por el consumo de alcohol y asociar el aumento en la acetilación de las histonas H3 y H4 con un aumento en la expresión de genes determinados.

## **6. CONCLUSIONES**



La conclusiones principales a las que se ha llegado en el presente trabajo son:

1. El etanol, a a dosis moderadas, activa la respuesta innata inmunitaria tanto *in vivo* como *in vitro* en macrófagos y en microglía induciendo la cascada de señalización asociada al receptor TLR4.

2. La activación de los receptores TLR4 por el etanol se produce a través de sus interacciones con los lípidos de membrana, provocando el reclutamiento de este receptor y de moléculas asociadas a su señalización a los *lipid rafts*. A través de este mecanismo podría actuar sobre otros receptores de membrana como el TLR2.

3. El etanol modula la inmunidad adaptativa produciendo un aumento de la expresión de moléculas MHC-I y II y de su reclutamiento hacia *lipid rafts* con tratamientos agudos e inhibiendo su expresión tras un largo consumo crónico.

4. Los efectos del etanol sobre el sistema inmunitario dependen del patrón de consumo (agudo vs crónico), de la dosis (concentraciones moderadas activan, mientras que altas inhiben) o de la presencia de otros ligandos de los receptores TLR (el tratamiento conjunto de etanol y LPS provoca una inhibición en la respuesta del LPS).

Finalmente, los resultados del presente estudio aportan nuevos mecanismos sobre las acciones moduladoras del etanol en el sistema inmunitario en macrófagos y microglia y abren nuevos horizontes de posibles dianas terapéuticas para paliar los efectos del consumo de alcohol en cerebro.



## **7. BIBLIOGRAFÍA**



- Abbas, K.A., Lichtman, A.H. and Pober, J.S. (1995) *Inmunología Celular y Molecular*. McGRAW-HILL.
- Akira, S. (2003) Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*, **278**, 38105-38108.
- Akira, S. and Sato, S. (2003) Toll-like receptors and their signaling mechanisms. *Scand J Infect Dis*, **35**, 555-562.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004a) Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol*, **327**, 581-589.
- Akira, S. and Takeda, K. (2004b) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- Allen, J.A., Halverson-Tamboli, R.A. and Rasenick, M.M. (2007) Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 128-140.
- Anderson, H.A., Hiltbold, E.M. and Roche, P.A. (2000) Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol*, **1**, 156-162.
- Arimilli, S., Johnson, J.B., Alexander-Miller, M.A. and Parks, G.D. (2007) TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NFkB-dependent pathways. *Virology*, **365**, 144-156.
- Auguet, T., Vidal, F., Lopez-Dupla, M., Broch, M., Gutierrez, C., Olona, M., Oltra, C., Aguilar, C., Gonzalez, E., Quer, J.C., Sirvent, J.J. and Richart, C. (2008) A study on the TNF-alpha system in Caucasian Spanish patients with alcoholic liver disease. *Drug Alcohol Depend*, **92**, 91-99.
- Babcock, A.A., Toft-Hansen, H. and Owens, T. (2008) Signaling through MyD88 regulates leukocyte recruitment after brain injury. *J Immunol*, **181**, 6481-6490.
- Babcock, A.A., Wrenfeldt, M., Holm, T., Nielsen, H.H., Dissing-Olesen, L., Toft-Hansen, H., Millward, J.M., Landmann, R., Rivest, S., Finsen, B. and Owens, T. (2006) Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci*, **26**, 12826-12837.
- Ballatore, C., Lee, V.M. and Trojanowski, J.Q. (2007) Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 663-672.
- Bautista, A.P. and 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**, 35-44.
- Besshoh, S., Bawa, D., Teves, L., Wallace, M.C. and Gurd, J.W. (2005) Increased phosphorylation and redistribution of NMDA receptors between synaptic lipid rafts and post-synaptic densities following transient global ischemia in the rat brain. *J Neurochem*, **93**, 186-194.
- Bjorkqvist, M., Wild, E.J., Thiele, J., Silvestroni, A., Andre, R., Lahiri, N., Raibon, E., Lee, R.V., Benn, C.L., Soulet, D., Magnusson, A., Woodman, B., Landles, C., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., Khalili-Shirazi, A., Lowdell, M.W., Brundin, P., Bates, G.P., Leavitt, B.R., Moller, T. and Tabrizi, S.J. (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med*, **205**, 1869-1877.
- Blanco, A.M. and Guerri, C. (2007) Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors. *Front Biosci*, **12**, 2616-2630.
- Blanco, A.M., Pascual, M., Valles, S.L. and Guerri, C. (2004) Ethanol-induced iNOS and COX-2 expression in cultured astrocytes via NF-kappa B. *Neuroreport*, **15**, 681-685.
- Blanco, A.M., Perez-Arago, A., Fernandez-Lizarbe, S. and Guerri, C. (2008) Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J Neurochem*, **106**, 625-639.
- Blanco, A.M., Valles, S.L., Pascual, M. and 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. *J Immunol*, **175**, 6893-6899.
- Block, M.L. and Hong, J.S. (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, **76**, 77-98.
- Block, M.L. and Hong, J.S. (2007) Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochem Soc Trans*, **35**, 1127-1132.
- Block, M.L., Zecca, L. and Hong, J.S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, **8**, 57-69.

- Boe, D.M., Nelson, S., Zhang, P., Quinton, L. and Bagby, G.J. (2003) Alcohol-induced suppression of lung chemokine production and the host defense response to *Streptococcus pneumoniae*. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**, 1838-1845.
- Campbell, A. (2004) Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann N Y Acad Sci*, **1035**, 117-132.
- Cao, C.X., Yang, Q.W., Lv, F.L., Cui, J., Fu, H.B. and Wang, J.Z. (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **353**, 509-514.
- Carpentier, P.A., Begolka, W.S., Olson, J.K., Elhofy, A., Karpus, W.J. and Miller, S.D. (2005) Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia*, **49**, 360-374.
- Carpentier, P.A., Duncan, D.S. and Miller, S.D. (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun*, **22**, 140-147.
- Cook, R.T. (1998) Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. *Alcohol Clin Exp Res*, **22**, 1927-1942.
- Cook, R.T., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J., Vandersteen, D., LaBrecque, D.R. and Cook, B.L. (1995) Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, **19**, 555-563.
- Cook, R.T., Li, F., Vandersteen, D., Ballas, Z.K., Cook, B.L. and LaBrecque, D.R. (1997) Ethanol and natural killer cells. I. Activity and immunophenotype in alcoholic humans. *Alcohol Clin Exp Res*, **21**, 974-980.
- Cook, R.T., Schlueter, A.J., Coleman, R.A., Tygrett, L., Ballas, Z.K., Jerrells, T.R., Nashelsky, M.B., Ray, N.B., Haugen, T.H. and Waldschmidt, T.J. (2007) Thymocytes, pre-B cells, and organ changes in a mouse model of chronic ethanol ingestion--absence of subset-specific glucocorticoid-induced immune cell loss. *Alcohol Clin Exp Res*, **31**, 1746-1758.
- Cook, R.T., Waldschmidt, T.J., Cook, B.L., Labrecque, D.R. and McLatchie, K. (1996) Loss of the CD5+ and CD45RAhi B cell subsets in alcoholics. *Clin Exp Immunol*, **103**, 304-310.
- Cook, R.T., Zhu, X., Coleman, R.A., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J., Ray, N.B., LaBrecque, D.R. and Cook, B.L. (2004) T-cell

- activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol*, **33**, 175-181.
- Couper, K.N., Blount, D.G. and Riley, E.M. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, **180**, 5771-5777.
- Crews, F.T., Bechara, R., Brown, L.A., Guidot, D.M., Mandrekar, P., Oak, S., Qin, L., Szabo, G., Wheeler, M. and Zou, J. (2006) Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 720-730.
- Crews, F.T. and Nixon, K. (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol*, **44**, 115-127.
- Chan, W.Y., Kohsaka, S. and Rezaie, P. (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, **53**, 344-354.
- Dai, Q. and Pruett, S.B. (2006a) Different Effects of Acute and Chronic Ethanol on LPS-Induced Cytokine Production and TLR4 Receptor Behavior in Mouse Peritoneal Macrophages. *J Immunotoxicol*, **3**, 217-225.
- Dai, Q. and Pruett, S.B. (2006b) Ethanol suppresses LPS-induced Toll-like receptor 4 clustering, reorganization of the actin cytoskeleton, and associated TNF-alpha production. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 1436-1444.
- Dai, Q., Zhang, J. and Pruett, S.B. (2005) Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 37-42.
- de la Monte, S.M. (1988) Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol*, **45**, 990-992.
- Ding, A.H., Porteu, F., Sanchez, E. and Nathan, C.F. (1990) Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release. *Science*, **248**, 370-372.
- Dixon, D.R. and Darveau, R.P. (2005) Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res*, **84**, 584-595.
- Dodeller, F. and Schulze-Koops, H. (2006) The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther*, **8**, 205.
- Dolganiuc, A., Bakis, G., Kodys, K., Mandrekar, P. and Szabo, G. (2006) Acute ethanol treatment modulates Toll-like receptor-4 association with lipid rafts. *Alcohol Clin Exp Res*, **30**, 76-85.

- Dolganiuc, A., Kodys, K., Kopasz, A., Marshall, C., Mandrekar, P. and Szabo, G. (2003) Additive inhibition of dendritic cell allostimulatory capacity by alcohol and hepatitis C is not restored by DC maturation and involves abnormal IL-10 and IL-2 induction. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**, 1023-1031.
- Duque Correa, M.A. and Rojas López, M. (2007) Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente. *Inmunología*, **26**, 73-86.
- Enomoto, N., Schemmer, P., Ikejima, K., Takei, Y., Sato, N., Brenner, D.A. and Thurman, R.G. (2001) Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res*, **25**, 1360-1367.
- Faraco, G., Pancani, T., Formentini, L., Mascagni, P., Fossati, G., Leoni, F., Moroni, F. and Chiarugi, A. (2006) Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol Pharmacol*, **70**, 1876-1884.
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M., Gascon, M.S., Blanco, A. and Guerri, C. (2008) Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol*, **45**, 2007-2016.
- Fernandez-Lizarbe, S., Pascual, M. and Guerri, C. (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol*.
- Fiala, M. and Veerhuis, R. (2009) Biomarkers of inflammation and amyloid-beta phagocytosis in patients at risk of Alzheimer disease. *Exp Gerontol*.
- Foster, S.L., Hargreaves, D.C. and Medzhitov, R. (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature*, **447**, 972-978.
- Frick, M., Bright, N.A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C. and Nichols, B.J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol*, **17**, 1151-1156.
- Giulian, D. and Baker, T.J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*, **6**, 2163-2178.

- Glezer, I., Simard, A.R. and Rivest, S. (2007) Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience*, **147**, 867-883.
- Goebel, J., Forrest, K., Flynn, D., Rao, R. and Roszman, T.L. (2002) Lipid rafts, major histocompatibility complex molecules, and immune regulation. *Hum Immunol*, **63**, 813-820.
- Gonzalez-Quintela, A., Alende, R., Gude, F., Campos, J., Rey, J., Meijide, L.M., Fernandez-Merino, C. and Vidal, C. (2008) Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities. *Clin Exp Immunol*, **151**, 42-50.
- Gonzalez-Quintela, A., Campos, J., Gude, F., Perez, L.F. and Tome, S. (2007) Serum concentrations of interleukin-8 in relation to different levels of alcohol consumption. *Cytokine*, **38**, 54-60.
- Gonzalez-Scarano, F. and Baltuch, G. (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*, **22**, 219-240.
- Goral, J., Karavitis, J. and Kovacs, E.J. (2008) Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol*, **42**, 237-247.
- Goral, J. and Kovacs, E.J. (2005) In vivo ethanol exposure down-regulates TLR2-, TLR4-, and TLR9-mediated macrophage inflammatory response by limiting p38 and ERK1/2 activation. *J Immunol*, **174**, 456-463.
- Graff, J. and Mansuy, I.M. (2009) Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci*, **30**, 1-8.
- Griffin, W.S. (2006) Inflammation and neurodegenerative diseases. *Am J Clin Nutr*, **83**, 470S-474S.
- Grunblatt, E., Mandel, S. and Youdim, M.B. (2000) Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci*, **899**, 262-273.
- Guerrini, I., Thomson, A.D. and Gurling, H.M. (2009) Molecular genetics of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*, **44**, 166-170.
- Gurley, C., Nichols, J., Liu, S., Phulwani, N.K., Esen, N. and Kielian, T. (2008) Microglia and Astrocyte Activation by Toll-Like

- Receptor Ligands: Modulation by PPAR-gamma Agonists. *PPAR Res*, **2008**, 453120.
- Gustot, T., Lemmers, A., Moreno, C., Nagy, N., Quertinmont, E., Nicaise, C., Franchimont, D., Louis, H., Deviere, J. and Le Moine, O. (2006) Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology*, **43**, 989-1000.
- Gutierrez-Ruiz, M.C., Gomez, J.L., Souza, V. and Bucio, L. (1995) Chronic and acute ethanol treatment modifies fluidity and composition in plasma membranes of a human hepatic cell line (WRL-68). *Cell Biol Toxicol*, **11**, 69-78.
- Hanisch, U.K. and Kettenmann, H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, **10**, 1387-1394.
- Haorah, J., Ramirez, S.H., Floreani, N., Gorantla, S., Morsey, B. and Persidsky, Y. (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med*, **45**, 1542-1550.
- Harder, T. and Simons, K. (1999) Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol*, **29**, 556-562.
- Harper, C. (1998) The neuropathology of alcohol-specific brain damage, or does alcohol damage the brain? *J Neuropathol Exp Neurol*, **57**, 101-110.
- Harper, C. (2009) The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol*, **44**, 136-140.
- Harper, C. and Matsumoto, I. (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol*, **5**, 73-78.
- Harry, G.J. and Kraft, A.D. (2008) Neuroinflammation and microglia: considerations and approaches for neurotoxicity assessment. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **4**, 1265-1277.
- He, J. and Crews, F.T. (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol*, **210**, 349-358.
- Heinz, R. and Waltenbaugh, C. (2007) Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. *Alcohol Clin Exp Res*, **31**, 1759-1771.

- Hiltbold, E.M., Poloso, N.J. and Roche, P.A. (2003) MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *J Immunol*, **170**, 1329-1338.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. and Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol*, **162**, 3749-3752.
- Hritz, I., Mandrekar, P., Velayudham, A., Catalano, D., Dolganiuc, A., Kodys, K., Kurt-Jones, E. and Szabo, G. (2008) The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology*, **48**, 1224-1231.
- Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., Brech, A., Latz, E. and Espevik, T. (2006) Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *Embo J*, **25**, 683-692.
- Ishida, N., Hara, T., Kamura, T., Yoshida, M., Nakayama, K. and Nakayama, K.I. (2002) Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J Biol Chem*, **277**, 14355-14358.
- Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Cosio, B., Chung, K.F., Adcock, I.M. and Barnes, P.J. (2002) A molecular mechanism of action of theophylline: Induction of histone deacetylase activity to decrease inflammatory gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 8921-8926.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, **5**, 987-995.
- Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A. and Antel, J.P. (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*, **175**, 4320-4330.
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Jin, J.J., Kim, H.D., Maxwell, J.A., Li, L. and Fukuchi, K. (2008) Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, **5**, 23.

- Jung, D.Y., Lee, H., Jung, B.Y., Ock, J., Lee, M.S., Lee, W.H. and Suk, K. (2005) TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol*, **174**, 6467-6476.
- Kato, N., Nakanishi, M. and Hirashima, N. (2006) Flotillin-1 regulates IgE receptor-mediated signaling in rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells. *J Immunol*, **177**, 147-154.
- Kawai, T. and Akira, S. (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, **13**, 460-469.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P.F., Sato, S., Hoshino, K. and Akira, S. (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*, **167**, 5887-5894.
- Kazantsev, A.G. and Thompson, L.M. (2008) Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 854-868.
- Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C.J., Logan, G. and Allen, J.I. (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology*, **13**, 267-276.
- Kigerl, K.A., Lai, W., Rivest, S., Hart, R.P., Satoskar, A.R. and Popovich, P.G. (2007) Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem*, **102**, 37-50.
- Kim, H.J., Rowe, M., Ren, M., Hong, J.S., Chen, P.S. and Chuang, D.M. (2007a) Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. *J Pharmacol Exp Ther*, **321**, 892-901.
- Kim, H.Y., Park, S.J., Joe, E.H. and Jou, I. (2006) Raft-mediated Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) regulation in microglia. *J Biol Chem*, **281**, 11872-11878.
- Kim, S.U. and de Vellis, J. (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*, **81**, 302-313.
- Kim, Y.S., Choi, D.H., Block, M.L., Lorenzl, S., Yang, L., Kim, Y.J., Sugama, S., Cho, B.P., Hwang, O., Browne, S.E., Kim, S.Y.,

- Hong, J.S., Beal, M.F. and Joh, T.H. (2007b) A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *Faseb J*, **21**, 179-187.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Laflamme, N., Soucy, G. and Rivest, S. (2001) Circulating cell wall components derived from gram-negative, not gram-positive, bacteria cause a profound induction of the gene-encoding Toll-like receptor 2 in the CNS. *J Neurochem*, **79**, 648-657.
- Latz, E., Visintin, A., Lien, E., Fitzgerald, K.A., Monks, B.G., Kurt-Jones, E.A., Golenbock, D.T. and Espevik, T. (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem*, **277**, 47834-47843.
- Lau, A.H., Abe, M. and 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. *J Leukoc Biol*, **79**, 941-953.
- Lau, A.H., Szabo, G. and Thomson, A.W. (2009) Antigen-presenting cells under the influence of alcohol. *Trends Immunol*, **30**, 13-22.
- Le Roy, C. and Wrana, J.L. (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 112-126.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P.L., Jensen, F.E., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. and Vartanian, T. (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci*, **22**, 2478-2486.
- Lehnardt, S., Lehmann, S., Kaul, D., Tschimmel, K., Hoffmann, O., Cho, S., Krueger, C., Nitsch, R., Meisel, A. and Weber, J.R. (2007) Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol*, **190**, 28-33.
- Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. and Vartanian, T. (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 8514-8519.

- Lenschow, D.J., Walunas, T.L. and Bluestone, J.A. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, **14**, 233-258.
- Lin, C.H., Kuan, I.H., Wang, C.H., Lee, H.M., Lee, W.S., Sheu, J.R., Hsiao, G., Wu, C.H. and Kuo, H.P. (2002) Lipoteichoic acid-induced cyclooxygenase-2 expression requires activations of p44/42 and p38 mitogen-activated protein kinase signal pathways. *Eur J Pharmacol*, **450**, 1-9.
- Lin, M.T. and Beal, M.F. (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, **443**, 787-795.
- Liu, B., Du, L., Kong, L.Y., Hudson, P.M., Wilson, B.C., Chang, R.C., Abel, H.H. and Hong, J.S. (2000) Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron-glia co-cultures. *Neuroscience*, **97**, 749-756.
- Liu, B. and Hong, J.S. (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther*, **304**, 1-7.
- Loiarro, M., Sette, C., Gallo, G., Ciacci, A., Fanto, N., Mastroianni, D., Carminati, P. and Ruggiero, V. (2005) Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- $\kappa$ B. *J Biol Chem*, **280**, 15809-15814.
- Loeches, S., Blanco, A.M., Pascual, M., Sanchez-Vera, I. and Guerri, C. Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. Artículo en revisión.
- Lopes, K.O., Sparks, D.L. and Streit, W.J. (2008) Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*, **56**, 1048-1060.
- Macatonia, S.E., Hosken, N.A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C.S., Culpepper, J.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K.M. and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, **154**, 5071-5079.
- Magee, T., Pirinen, N., Adler, J., Pagakis, S.N. and Parmryd, I. (2002) Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. *Biol Res*, **35**, 127-131.

- Mandrekar, P., Catalano, D., Dolganiuc, A., Kodys, K. and Szabo, G. (2004) Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. *J Immunol*, **173**, 3398-3407.
- Mandrekar, P., Catalano, D. and Szabo, G. (1997) Alcohol-induced regulation of nuclear regulatory factor-kappa beta in human monocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, **21**, 988-994.
- Mandrekar, P., Catalano, D. and Szabo, G. (1999) Inhibition of lipopolysaccharide-mediated NFkappaB activation by ethanol in human monocytes. *Int Immunol*, **11**, 1781-1790.
- Mandrekar, P., Dolganiuc, A., Bellerose, G., Kodys, K., Romics, L., Nizamani, R. and Szabo, G. (2002) Acute alcohol inhibits the induction of nuclear regulatory factor kappa B activation through CD14/toll-like receptor 4, interleukin-1, and tumor necrosis factor receptors: a common mechanism independent of inhibitory kappa B alpha degradation? *Alcohol Clin Exp Res*, **26**, 1609-1614.
- Mandrekar, P. and Szabo, G. (2009) Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation. *J Hepatol*, **50**, 1258-1266.
- Manes, S., del Real, G. and Martinez, A.C. (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol*, **3**, 557-568.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A. and Locati, M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, **13**, 453-461.
- McCoy, C.E. and O'Neill, L.A. (2008) The role of toll-like receptors in macrophages. *Front Biosci*, **13**, 62-70.
- McCoy, M.K. and Tansey, M.G. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation*, **5**, 45.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000a) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*, **173**, 89-97.
- Medzhitov, R. and Janeway, C., Jr. (2000b) Innate immunity. *N Engl J Med*, **343**, 338-344.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- Meyerholz, D.K., Edsen-Moore, M., McGill, J., Coleman, R.A., Cook, R.T. and Legge, K.L. (2008) Chronic alcohol consumption

- increases the severity of murine influenza virus infections. *J Immunol*, **181**, 641-648.
- Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, **17**, 138-146.
- Nagy, L.E. (2003) Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 882-890.
- Najafian, N. and Khoury, S.J. (2003) T cell costimulatory pathways: blockade for autoimmunity. *Expert Opin Biol Ther*, **3**, 227-236.
- Napoli, I. and Neumann, H. (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, **158**, 1030-1038.
- Nichols, B. (2003) Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J Cell Sci*, **116**, 4707-4714.
- Nishina, H., Wada, T. and Katada, T. (2004) Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem*, **136**, 123-126.
- O'Neill, L.A. (2003) The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans*, **31**, 643-647.
- O'Neill, L.A. and Bowie, A.G. (2007) The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **7**, 353-364.
- Oak, S., Mandrekar, P., Catalano, D., Kodys, K. and Szabo, G. (2006) TLR2- and TLR4-mediated signals determine attenuation or augmentation of inflammation by acute alcohol in monocytes. *J Immunol*, **176**, 7628-7635.
- Okun, E., Griffioen, K.J., Lathia, J.D., Tang, S.C., Mattson, M.P. and Arumugam, T.V. (2009) Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev*, **59**, 278-292.
- Olson, J.K. and Miller, S.D. (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*, **173**, 3916-3924.
- Olsson, S. and Sundler, R. (2006) The role of lipid rafts in LPS-induced signaling in a macrophage cell line. *Mol Immunol*, **43**, 607-612.
- Pais, T.F., Figueiredo, C., Peixoto, R., Braz, M.H. and Chatterjee, S. (2008) Necrotic neurons enhance microglial neurotoxicity through induction of glutaminase by a MyD88-dependent pathway. *J Neuroinflammation*, **5**, 43.

- Park, B.S., Song, D.H., Kim, H.M., Choi, B.S., Lee, H. and Lee, J.O. (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, **458**, 1191-1195.
- Park, K.W., Lee, H.G., Jin, B.K. and Lee, Y.B. (2007) Interleukin-10 endogenously expressed in microglia prevents lipopolysaccharide-induced neurodegeneration in the rat cerebral cortex in vivo. *Exp Mol Med*, **39**, 812-819.
- Pascual, M., Blanco, A.M., Cauli, O., Minarro, J. and Guerri, C. (2007) Intermittent ethanol exposure induces inflammatory brain damage and causes long-term behavioural alterations in adolescent rats. *Eur J Neurosci*, **25**, 541-550.
- Pascual, M. and Guerri, C. (2007) The peptide NAP promotes neuronal growth and differentiation through extracellular signal-regulated protein kinase and Akt pathways, and protects neurons co-cultured with astrocytes damaged by ethanol. *J Neurochem*, **103**, 557-568.
- Pascual, M., Valles, S.L., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (2003) Ceramide pathways modulate ethanol-induced cell death in astrocytes. *J Neurochem*, **87**, 1535-1545.
- Pelkmans, L., Burli, T., Zerial, M. and Helenius, A. (2004) Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell*, **118**, 767-780.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001) Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, **3**, 473-483.
- Peters, T.J. and Preedy, V.R. (1998) Metabolic consequences of alcohol ingestion. *Novartis Found Symp*, **216**, 19-24; discussion 24-34.
- Pfefferbaum, A. (2004) Alcoholism damages the brain, but does moderate alcohol use? *Lancet Neurol*, **3**, 143-144.
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E.V., Mathalon, D.H., Shear, P.K., Rosenbloom, M.J. and Lim, K.O. (1995) Longitudinal changes in magnetic resonance imaging brain volumes in abstinent and relapsed alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*, **19**, 1177-1191.
- Pike, L.J. (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res*, **44**, 655-667.

- Pineau, I. and Lacroix, S. (2009) Endogenous signals initiating inflammation in the injured nervous system. *Glia*, **57**, 351-361.
- Poloso, N.J., Muntasell, A. and Roche, P.A. (2004) MHC class II molecules traffic into lipid rafts during intracellular transport. *J Immunol*, **173**, 4539-4546.
- Poloso, N.J. and Roche, P.A. (2004) Association of MHC class II-peptide complexes with plasma membrane lipid microdomains. *Curr Opin Immunol*, **16**, 103-107.
- Ponce, J., de la Ossa, N.P., Hurtado, O., Millan, M., Arenillas, J.F., Davalos, A. and Gasull, T. (2008) Simvastatin reduces the association of NMDA receptors to lipid rafts: a cholesterol-mediated effect in neuroprotection. *Stroke*, **39**, 1269-1275.
- Probert, L. and Akassoglou, K. (2001) Glial expression of tumor necrosis factor in transgenic animals: how do these models reflect the "normal situation"? *Glia*, **36**, 212-219.
- Pruett, S.B., Fan, R., Zheng, Q. and Schwab, C. (2005) Differences in IL-10 and IL-12 production patterns and differences in the effects of acute ethanol treatment on macrophages in vivo and in vitro. *Alcohol*, **37**, 1-8.
- Pruett, S.B., Schwab, C., Zheng, Q. and Fan, R. (2004a) Suppression of innate immunity by acute ethanol administration: a global perspective and a new mechanism beginning with inhibition of signaling through TLR3. *J Immunol*, **173**, 2715-2724.
- Pruett, S.B., Zheng, Q., Fan, R., Matthews, K. and Schwab, C. (2004b) Acute exposure to ethanol affects Toll-like receptor signaling and subsequent responses: an overview of recent studies. *Alcohol*, **33**, 235-239.
- Pruett, S.B., Zheng, Q., Fan, R., Matthews, K. and Schwab, C. (2004c) Ethanol suppresses cytokine responses induced through Toll-like receptors as well as innate resistance to *Escherichia coli* in a mouse model for binge drinking. *Alcohol*, **33**, 147-155.
- Qin, L., He, J., Hanes, R.N., Pluzarev, O., Hong, J.S. and Crews, F.T. (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation*, **5**, 10.
- Quinton, L.J., Nelson, S., Zhang, P., Happel, K.I., Gamble, L. and Bagby, G.J. (2005) Effects of systemic and local CXC chemokine administration on the ethanol-induced suppression

- of pulmonary neutrophil recruitment. *Alcohol Clin Exp Res*, **29**, 1198-1205.
- Rahman, I. (2002) Oxidative stress, transcription factors and chromatin remodelling in lung inflammation. *Biochem Pharmacol*, **64**, 935-942.
- Ransohoff, R.M. and Perry, V.H. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, **27**, 119-145.
- Raschke, W.C., Baird, S., Ralph, P. and Nakoinz, I. (1978) Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, **15**, 261-267.
- Reynolds, K., Lewis, B., Nolen, J.D., Kinney, G.L., Sathya, B. and He, J. (2003) Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *Jama*, **289**, 579-588.
- Rivest, S. (2009) Regulation of innate immune responses in the brain. *Nat Rev Immunol*, **9**, 429-439.
- Rollinghoff, M. (1997) Immunity, components of the immune system and immune response. *Biologicals*, **25**, 165-168.
- Roux, P.P. and Blenis, J. (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, **68**, 320-344.
- Rubinfeld, H. and Seger, R. (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*, **31**, 151-174.
- Saeed, R.W., Varma, S., Peng, T., Tracey, K.J., Sherry, B. and Metz, C.N. (2004) Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. *J Immunol*, **173**, 6376-6383.
- Saura, J., Tusell, J.M. and Serratosa, J. (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, **44**, 183-189.
- Servant, M.J., ten Oever, B., LePage, C., Conti, L., Gessani, S., Julkunen, I., Lin, R. and Hiscott, J. (2001) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem*, **276**, 355-363.
- Setzu, A., Lathia, J.D., Zhao, C., Wells, K., Rao, M.S., Ffrench-Constant, C. and Franklin, R.J. (2006) Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells. *Glia*, **54**, 297-303.
- Shin, D.M., Yang, C.S., Lee, J.Y., Lee, S.J., Choi, H.H., Lee, H.M., Yuk, J.M., Harding, C.V. and Jo, E.K. (2008) Mycobacterium

- tuberculosis lipoprotein-induced association of TLR2 with protein kinase C zeta in lipid rafts contributes to reactive oxygen species-dependent inflammatory signalling in macrophages. *Cell Microbiol*, **10**, 1893-1905.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **1**, 31-39.
- Song, K., Coleman, R.A., Zhu, X., Alber, C., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J. and Cook, R.T. (2002) Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J Leukoc Biol*, **72**, 1109-1116.
- Streit, W.J., Mraz, R.E. and Griffin, W.S. (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, **1**, 14.
- Sugama, S., Fujita, M., Hashimoto, M. and Conti, B. (2007) Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience*, **146**, 1388-1399.
- Sullivan, E.V. and Zahr, N.M. (2008) Neuroinflammation as a neurotoxic mechanism in alcoholism: commentary on "Increased MCP-1 and microglia in various regions of human alcoholic brain". *Exp Neurol*, **213**, 10-17.
- Sumbayev, V.V. and Yasinska, I.M. (2006) Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand J Immunol*, **63**, 391-400.
- Suuronen, T., Huuskonen, J., Nuutinen, T. and Salminen, A. (2006) Characterization of the pro-inflammatory signaling induced by protein acetylation in microglia. *Neurochem Int*, **49**, 610-618.
- Suuronen, T., Huuskonen, J., Pihlaja, R., Kyrylenko, S. and Salminen, A. (2003) Regulation of microglial inflammatory response by histone deacetylase inhibitors. *J Neurochem*, **87**, 407-416.
- Szabo, G. (1999) Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*, **34**, 830-841.
- Szabo, G., Dolganiuc, A., Mandrekar, P. and White, B. (2004) Inhibition of antigen-presenting cell functions by alcohol: implications for hepatitis C virus infection. *Alcohol*, **33**, 241-249.
- Szabo, G. and Mandrekar, P. (2009) A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res*, **33**, 220-232.

- Szabo, G., Mandrekar, P. and Catalano, D. (1995) Inhibition of superantigen-induced T cell proliferation and monocyte IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 production by acute ethanol treatment. *J Leukoc Biol*, **58**, 342-350.
- Szabo, G., Mandrekar, P. and Dolganiuc, A. (2007) Innate immune response and hepatic inflammation. *Semin Liver Dis*, **27**, 339-350.
- Taguchi, T., Mitcham, J.L., Dower, S.K., Sims, J.E. and Testa, J.R. (1996) Chromosomal localization of TIL, a gene encoding a protein related to the Drosophila transmembrane receptor Toll, to human chromosome 4p14. *Genomics*, **32**, 486-488.
- Takeda, K. and Akira, S. (2005) Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, **17**, 1-14.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.
- Tang, S.C., Arumugam, T.V., Xu, X., Cheng, A., Mughal, M.R., Jo, D.G., Lathia, J.D., Siler, D.A., Chigurupati, S., Ouyang, X., Magnus, T., Camandola, S. and Mattson, M.P. (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 13798-13803.
- Tanoue, T. and Nishida, E. (2003) Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*, **15**, 455-462.
- Torii, S., Yamamoto, T., Tsuchiya, Y. and Nishida, E. (2006) ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci*, **97**, 697-702.
- Toshchakov, V., Jones, B.W., Perera, P.Y., Thomas, K., Cody, M.J., Zhang, S., Williams, B.R., Major, J., Hamilton, T.A., Fenton, M.J. and Vogel, S.N. (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol*, **3**, 392-398.
- Triantafilou, M., Gamper, F.G., Haston, R.M., Mouratis, M.A., Morath, S., Hartung, T. and Triantafilou, K. (2006) Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*, **281**, 31002-31011.
- Triantafilou, M., Miyake, K., Golenbock, D.T. and Triantafilou, K. (2002) Mediators of innate immune recognition of bacteria

- concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. *J Cell Sci*, **115**, 2603-2611.
- Triantafilou, M., Morath, S., Mackie, A., Hartung, T. and Triantafilou, K. (2004) Lateral diffusion of Toll-like receptors reveals that they are transiently confined within lipid rafts on the plasma membrane. *J Cell Sci*, **117**, 4007-4014.
- Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2005) The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res*, **11**, 5-11.
- Trinchieri, G. (1997) Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol*, **9**, 17-23.
- Uesugi, T., Froh, M., Arteel, G.E., Bradford, B.U. and Thurman, R.G. (2001) Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology*, **34**, 101-108.
- Valledor, A.F., Borrás, F.E., Cullell-Young, M. and Celada, A. (1998) Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J Leukoc Biol*, **63**, 405-417.
- Valles, S.L., Blanco, A.M., Azorin, I., Guasch, R., Pascual, M., Gomez-Lechon, M.J., Renau-Piqueras, J. and Guerri, C. (2003) Chronic ethanol consumption enhances interleukin-1-mediated signal transduction in rat liver and in cultured hepatocytes. *Alcohol Clin Exp Res*, **27**, 1979-1986.
- Valles, S.L., Blanco, A.M., Pascual, M. and Guerri, C. (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol*, **14**, 365-371.
- Vidali, M., Stewart, S.F. and Albano, E. (2008) Interplay between oxidative stress and immunity in the progression of alcohol-mediated liver injury. *Trends Mol Med*, **14**, 63-71.
- Villafuerte, I.R. (1990) *Agresión por agentes biológicos y respuesta del hospedero*. Editorial Pueblo y Educación.
- Villegas, S.N., Njaine, B., Linden, R. and Carri, N.G. (2006) Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Res Bull*, **71**, 116-126.
- Weinstein, J.R., Swarts, S., Bishop, C., Hanisch, U.K. and Moller, T. (2008) Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia*, **56**, 16-26.

- Wheeler, M.D. (2003) Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*, **27**, 300-306.
- Whitmarsh, A.J. (2007) Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, **1773**, 1285-1298.
- Wilms, H., Rosenstiel, P., Sievers, J., Deuschl, G., Zecca, L. and Lucius, R. (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *Faseb J*, **17**, 500-502.
- Xaus, J., Comalada, M., Villedor, A.F., Cardo, M., Herrero, C., Soler, C., Lloberas, J. and Celada, A. (2001) Molecular mechanisms involved in macrophage survival, proliferation, activation or apoptosis. *Immunobiology*, **204**, 543-550.
- Yang, B., Oo, T.N. and Rizzo, V. (2006) Lipid rafts mediate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro-survival effects in cultured endothelial cells. *Faseb J*, **20**, 1501-1503.
- Zhang, W., Wang, T., Pei, Z., Miller, D.S., Wu, X., Block, M.L., Wilson, B., Zhang, W., Zhou, Y., Hong, J.S. and Zhang, J. (2005) Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *Faseb J*, **19**, 533-542.
- Zhu, X., Coleman, R.A., Alber, C., Ballas, Z.K., Waldschmidt, T.J., Ray, N.B., Krieg, A.M. and Cook, R.T. (2004) Chronic ethanol ingestion by mice increases expression of CD80 and CD86 by activated macrophages. *Alcohol*, **32**, 91-100.
- Ziegler, G., Harhausen, D., Schepers, C., Hoffmann, O., Rohr, C., Prinz, V., König, J., Lehrach, H., Nietfeld, W. and Trendelenburg, G. (2007) TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 574-579.
- Zuo, G., Gong, J., Liu, C., Wu, C., Li, S. and Dai, L. (2003) Synthesis of Toll-like receptor 4 in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *Chin Med J (Engl)*, **116**, 297-300.