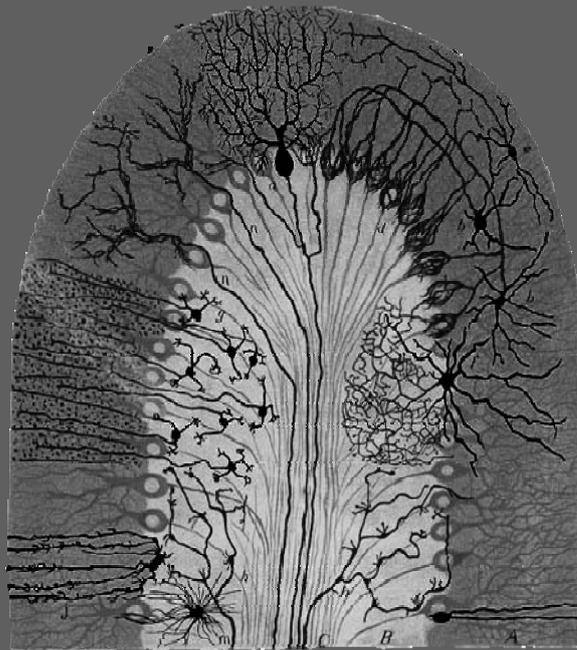




UNIVERSITAT [Logo] VALÈNCIA Facultat de Ciències Biològiques

Departamento de Biología Celular y Parasitología
Centro de Investigación Príncipe Felipe

IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES TLR4 EN EL DAÑO CEREBRAL CAUSADO POR EL CONSUMO DE ALCOHOL



TESIS DOCTORAL
SILVIA ALFONSO LOECHES
2012

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Facultad de Biología
Centro de Investigación Príncipe Felipe



UNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

**“IMPLICACIÓN DE LOS
RECEPTORES TLR4 EN EL DAÑO
CEREBRAL CAUSADO POR EL
CONSUMO DE ALCOHOL”**

Tesis doctoral

Presentada por: Silvia Alfonso Loeches

Dirigida por: Dra. Consuelo Guerri Sirera

Tutoría: Dr. Juan Nácher Roselló

Programa doctorado
NEUROCIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Valencia, 2012



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

CONSUELO GUERRI SIRERA, Dra. en Ciencias Biológicas e Investigadora del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Laboratorio de Patología Celular.

CERTIFICO:

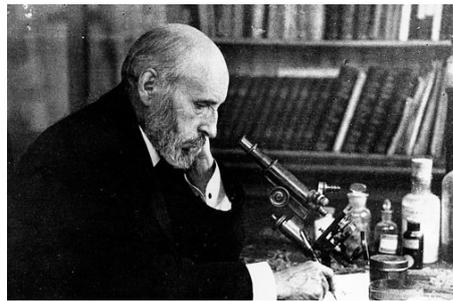
Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por **D^a Silvia Alfonso Loeches** que lleva por título "*Implicación de los receptores TLR4 en el daño cerebral causado por el consumo de alcohol*" ha sido realizada bajo mi dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscribe en Valencia, a 25 de Mayo de 2012

Fdo.: Dra. Consuelo Guerri Sirera

«Todo hombre puede ser, si se lo propone, escultor de su propio cerebro».

S. Ramón y Cajal



Santiago Ramón y Cajal, padre de la Neurociencia y Premio Nobel de Medicina y Fisiología, 1906.

La ilustración de la portada representa un corte transversal semi-esquemático de una circunvolución cerebelosa de mamífero, según Ramón y Cajal. Realizada para ilustrar unas conferencias pronunciadas en 1894, ante la Academia de Ciencias Médicas de Cataluña

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis ha sido realizada con mucho esfuerzo y con el apoyo y el cariño de muchísimas personas que me han ayudado a superar los momentos difíciles y a no abandonar nunca mi objetivo, que llegase por fin el día esperado, tras casi 5 años de duro trabajo.

En primer lugar, me gustaría agradecerle a mi directora de tesis, la Dra. Consuelo Guerri, que me brindó la oportunidad de volver a España e incorporarme a su equipo de investigación. Gracias Chelo, por tu ayuda y todo lo que me has enseñado en estos años, no sólo de ciencia...

Agradecer a la Dra. Isabel Fariñas, por guiarme hacia Chelo Guerri cuando necesitaba orientación en mi carrera profesional, y por brindarme su ayuda siempre que la he necesitado.

Quiero agradecerle también al Dr. Ulises Gómez-Pinedo, por su paciencia y dedicación a ayudarme en los obstáculos que se me iban presentando, y sobretodo por sus consejos en inmunohistoquímica, ¡Gracias por esas imágenes de libro!

Me gustaría agradecerle también, como no, a mis compañeros de laboratorio, muchos de ellos amigos, aunque se hayan ido a otro sitio: Gracias Marisa, por ser cómo eres y demostrarme que siempre hay un camino alternativo, por tus buenos consejos, esas risas increíbles, esas figuras impresionantes que me enseñaste a hacer, esos miércoles tertulianos con cafenet y sobretodo por ser mi mejor amiga durante todo este tiempo y en el futuro, gracias a ti por todo. Raquel, siempre constante en tu trabajo, lo has demostrado, eres genial. Irene, que decirte, lo que nos hemos reído del mundo, y siempre has estado ahí. Maya, mi compi y amiga siempre en los buenos y los malos momentos. Rosa Guasch, eres estupenda y tus consejos me han ayudado mucho. A todo el minigrup, chicos sois los mejores, no cambiéis nunca, ya sabéis quienes sois... María, qué decirte que no sepas ya, por todos esos cotilleos y esas risas, eres una persona genial y siempre me has ayudado, ¡gracias de corazón! Majo, eres mi amiga y con eso te lo digo todo, siempre estaré ahí, sin tí tampoco hubiese sido lo mismo... Juan, mi nuevo compi y amigo, que me ha dado siempre su mejor sonrisa en tiempos difíciles...ya verás como ahora sí cogemos carrerilla. También a Sara y Blanca, gracias por momentos inolvidables. A los nuevos chicos, Toni y Jorge, que han conseguido establecer paridad en el laboratorio y por esas tardes de risas y chismes... ¡Por fin tengo índice! Bueno, y no olvidarme del resto de gente con la que he compartido muchas cosas estos años y me han ayudado en algún momento crítico como mi Mara, Jelena, Jorge Oliver "genio del ilustrator" y amigo, muchas gracias por tu ayuda!, Vicent y Josh ¿oís a los delfines?, gracias por estar siempre pendientes de ayudarme con cualquier problema...a nuestros vecinos de siempre, que ya no están como Maca, Vanesa, Jaime, Leo y Bárbara, también a Imelda, Ana, Pablo B., Mario, Mari Carmen, Luz, Virginia, mis técnicos preferidos del confocal, Alberto y Eva, y con mención especial al Dr. Jaime Renau por esas fotos de portada...Sois tantos que en fin,

perdonarme si se me olvida alguien...estoy muy agradecida a todos y cada uno de vosotros por hacerme esto mucho más llevadero durante estos años.

Agradecer a todos mis amigos, sobretodo a Kris y Jess, mis incondicionales y a Nelly, por saber que siempre están ahí, gracias de corazón, me habéis ayudado a que llegue este día.

Agradezco también a toda mi familia, especialmente a mi madre, esa gran mujer que ha conseguido con su incansable espíritu que yo llegue donde estoy, a mi padre que donde esté, seguro que se siente orgulloso de mí, y a mi tete, mi hermano Vicent por estar ahí "siempre". A mis suegros, Mano y Paco, a mis cuñados Tara y Elena, a Josep y a Cesc mis niños del alma, a mi cuñada Sonia, a Mapi a la que quiero muchísimo, y en general a todos, por ser una parte especial de mi vida.

Por último, le doy las gracias a mi marido, Paco, por estar siempre a mi lado, apoyándome en todo momento, por aguantar mis momentos de nerviosismo compulsivo durante la tesis y simplemente por hacerme FELIZ.

A mi familia

ABREVIATURAS

- AD:** dominio de activación
- ADN:** ácido desoxiribonucleico
- AP-1:** proteína activadora tipo 1
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNds:** ácido ribonucleico de doble cadena
- ARNm:** ácido ribonucleico tipo mensajero
- ASC:** proteína que contiene un dominio de reclutamiento CARD y activación de caspasas
- ATP:** adenosina tri-fosfato
- BBB:** barrera hematoencefálica
- BSA:** suero albúmina bovina
- CA3:** caspasa-3
- CAPS:** síndromes de enfermedades autoinflamatorias asociados a la criopirina
- CARD:** dominio de reclutamiento de caspasa
- CASP-1:** caspasa-1
- CC:** cuerpo calloso
- CD14:** cluster de diferenciación 14
- CD45:** cúmulo de diferenciación 45
- CD68:** cúmulo de diferenciación 68
- CIITA:** transactivador del complejo MHCII
- cm:** centímetros
- CNPasa:** 2'-3'-nucleótido cíclico fosfohidrolasa
- COX-2:** ciclo-oxigenasa-2
- CTX:** córtex
- CYP2E1:** citocromo P450 tipo 2E1
- DAB:** 3,3'-diaminobencidina
- DAMPs:** patrones moleculares endógenos asociados a daño
- DAPI:** diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
- dl:** decilitros
- DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO:** dimetil sulfóxido

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etileno diaminotetraacético

EGTA: ácido tetraacético+ etilenglicol

EM: Esclerosis múltiple

ERK_{1/2}: quinasa regulada por señales extracelulares

FASD: trastornos del espectro alcohólico fetal

FasL: ligando de Fas

FIIND: dominio con función de búsqueda

FJB: fluoroJade B

GABA: ácido gamma-aminobutírico

GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía

GFP: proteína fluorescente verde

GPI: glicofosfatidil-inositol

gr: gramos

h: horas

HAT: histonas acetil-transferasas

HRP: peroxidada de rábano

IBA-1: ionized calcium binding adaptor molecule 1

IAP: proteína inhibidora apoptosis

IFN- α : interferón tipo alfa

IFN- β : interferón tipo beta

IFN- γ : interferón tipo gamma

Ig: inmunoglobulina

IKK: quinasa asociada al complejo I κ B- α

IL-10: interleuquina tipo 10

IL-18: interleuquina tipo 18

IL-1RI: receptor de interleuquina-1-beta tipo I

IL-1 β : interleuquina-1 tipo beta

IL-33: interleuquina tipo 33

IL-6: interleuquina tipo 6

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IPAF: factor activación proteasa convirtiendo la IL-1

IRAK: protein-quinasa asociada al receptor IL-1RI
IRF-3: factor regulador de interferón
IVIs: sistema de imagen *in vivo*
IκB: inhibidor de κB
kDa: kilodalton
kg: kilogramos
L: litros
LAL: lisado de amebocitos de Limulus
LCR: líquido cefalorraquídeo
LFB: luxol fast blue
LPS: lipopolisacárido
LRR: repeticiones ricas en leucina
M: molar
MAG: glicoproteína asociada a la mielina
MAP-2: proteína asociada a microtúbulos 2
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MBP: proteína básica de mielina
MCP-1: quimiocina o proteína quimiotáctica de monocitos-1
MD-2: proteína de diferenciación mieloide 2
ME: mercaptoetanol
mg: miligramos
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
min.: minutos
ml: mililitro
mm: milímetros
mM: milimolar
mm²: milímetro cuadrado
MOG: glicoproteína oligodendrocítica de la mielina
MPO: mieloperoxidasa
MSU: cristales de ácido úrico
MyD88: factor de diferenciación o proteína adaptadora derivada de mieloide 88
NACH: proteína asociada a la telomerasa

NAD: dominio asociado a NACHT
NAIP: proteína inhibidora de la apoptosis neuronal
NALP: dominio NACHT
NegCsiRNA: control negativo de siRNA
NF-kB: factor de transcripción kappa B
ng: nanogramos
NG2: proteoglicano condroitín sulfato
NK: célula natural killer
NLRCs: receptores NLR que contienen el dominio CARD
NLRP3: criopirina o NALP3
NLRPs: receptores NLR que contienen el dominio PYD
NLRs: receptores NOD-like (tipo de oligomerización unida a nucleótidos)
nm: nanómetros
nM: nanomolar
NMDA: N-metil-D-Aspartato
NOD: dominio de oligomerización del nucleósido en los receptores NLR
NOS: especies reactivas de óxido nítrico
PAMPs: patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos
PB: tampón fosfato
PBS: tampón fosfato salino
PFC: corteza prefrontal
pg: picogramos
PGN: peptidoglicanos
PLP: proteína proteolípida
PMBS: sulfato de polimixina B
PMN: polimorfonucleares neutrófilos
PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro
pNA: p-nitroanilida
PRRs: receptores de reconocimiento de patrones
PVDF: difluoruro de polivinilideno
PYD: dominio de pirinas y que contiene LRR
ROS: especies reactivas de oxígeno

SBF: suero bovino fetal
SDS: dodecil sulfato sódico
siRNA: ARN silenciador
SNC: Sistema Nervioso Central
STAT: transductor de señal y activador de la transcripción
T.A.: temperatura ambiente
TBS: tampón tris salino
TIR: dominio Toll-IL-1R
TLR4: receptor Toll-like tipo 4
TLRs: receptores Toll-like
TNF- α : factor de necrosis tumoral tipo alfa
TRAF6: factor asociado al receptor de TNF- α tipo 6
TRAM: molécula adaptadora relacionada con TRIF
TRIF: factor Toll-IL-1R
TRITC: rodamina
v/v: volumen/volumen
V: voltios
WHO: Organización Mundial de la Salud
 μ g: microgramos
 μ m²: micras cuadradas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	3
1.1.1. El cerebro y componentes sensibles al alcohol.....	4
1.1.2. La sustancia blanca.....	5
1.1.3. La corteza cerebral.....	7
1.1.4. El hipocampo.....	10
1. 2. SISTEMA INMUNITARIO.....	13
1.2.1. Componentes del Sistema Inmunológico.....	13
1.2.2. Sistema Inmune Innato.....	16
1.2.3. Papel de los astrocitos en la respuesta innata inmune.....	17
1.2.4. Papel de la microglía en la respuesta innata inmune.....	18
1.3. RECEPTORES DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO.....	20
1.3.1. Receptores tipo Toll.....	21
1.3.1.1. Patrones de expresión y ligandos de los receptores TLRs.....	22
1.3.1.2. Activación de los receptores TLRs.....	23
1.3.1.3. Unión del LPS al complejo TLR4/MD-2.....	25
1.3.1.4. TLRs y neurodegeneración.....	27
1.3.2 Receptores NLRs: Inflamasoma.....	30
1.3.2.1. Receptores tipo NLR (CATERPILLERS, NOD-LRRs o NACHT-LRRs).....	31
1.3.2.2 El inflamasoma NLRP3.....	34
1. 4. ALCOHOL, SISTEMA INMUNITARIO Y DAÑO CEREBRAL.....	36
1.4.1. Efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario.....	36
1.4.2. Efectos del consumo de alcohol en el cerebro.....	37
2. OBJETIVOS.....	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	47
3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	49
3.2. CULTIVOS CELULARES.....	49

3.3. TRATAMIENTO DE ETANOL EN CULTIVOS CELULARES Y ADMINISTRACIÓN DE ETANOL A ANIMALES.	50
3.3.1. Tratamiento de astrocitos con etanol.....	50
3.3.2. Bloqueo de CD14.	51
3.3.3. Administración crónica de etanol in vivo.....	52
3.4. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE.	52
3.5. TRANSFECCIONES.	52
3.6. AISLAMIENTO DE FRACCIONES SUBCELULARES DE ASTROCITOS.	53
3.7. OBTENCIÓN DE LISADOS DE CÉLULAS Y TEJIDOS....	54
3.8. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.....	54
3.9. PREPARACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL: ESTUDIO IN VIVO.	57
3.10. INMUNOHISTOQUÍMICA.	57
3.10.1. Técnica de Inmunoperoxidasa indirecta: GFAP, CD11b, Caspasa-3, MBP, acetyl-histona H3 y h4.....	57
3.10.2. Marcaje de IBA-1 ⁺ con la técnica de inmunoperoxidasa: análisis de la transformación microglial.....	59
3.10.3. Cuantificación de la activación de la microglía: Sistema de Anillos.	60
3.10.4. Tinciones de Nissl y Luxol Fast Blue (LFB).	61
3.10.4.1. Tinción Luxol Fast Blue (LFB).....	61
3.10.4.2. Tinción de Nissl.....	62
3.10.5. Medida de Degeneración neuronal: Técnica de FluoroJade B (FJB).	62
3.10.6. Inmunofluorescencia, simple y doble marcaje: NG2 y OLIG-caspasa-3.....	63
3.10.6.1. Inmunofluorescencia de NG2.....	63
3.10.6.2. Doble Inmunofluorescencia de Caspasa-3 y Oligodendrocitos.	64
3.11. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	65

3.12. MEDIDA DE APOPTOSIS: CASPASA-3 y CASPASA-1.	65
3.12.1. Medida de Caspasa-3.....	66
3.12.2. Inmunofluorescencia de caspasa-1.....	66
3.12.3. Medida de la actividad de caspasa-1.....	66
3.13. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS.....	67
3.14. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)...	67
3.15. SISTEMA DE IMAGEN IN VIVO.	69
3.16. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	69
4. RESULTADOS	71
4.1 EL ETANOL CAUSA NEUROINFLAMACIÓN Y DAÑO CEREBRAL: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4.	73
4.1.1. El silenciamiento de la función del receptor TLR4 evita la activación de la cascada inflamatoria inducida por etanol en astroglía.	73
4.1.2. CD14 y MD-2 participan en la activación de la respuesta innata inmune mediada por los receptores TLR4 e inducida por etanol en astroglía.....	75
4.1.3. El tratamiento de etanol no activa la respuesta inflamatoria en astrocitos de ratones TLR4 knockout.	78
4.1.4. Papel de los receptores TLR4 en la activación glial, neuroinflamación y neurodegeneración inducida por el etanol en cerebro.	80
4.1.4.1. Las células gliales se activan en cerebros de animales con un tratamiento crónico de etanol.	80
4.1.4.2. El etanol activa la señalización del TLR4 en corteza cerebral de animales con un consumo crónico.....	82
4.1.4.3. El consumo crónico de alcohol induce citoquinas y mediadores inflamatorios en cerebro.	84
4.1.4.4. El tratamiento crónico de alcohol activa la caspasa-3 e induce degeneración neuronal.	90

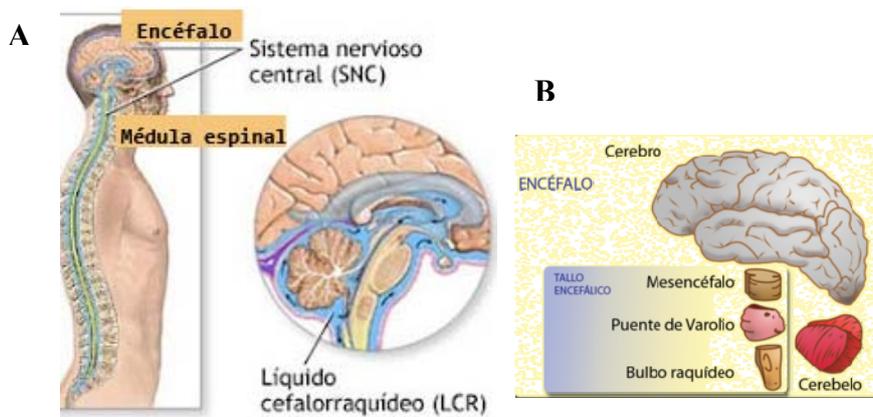
4.2 PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 Y LA RESPUESTA DE LOS TLR4 EN LA NEUROINFLAMACIÓN PRODUCIDA POR EL ALCOHOL.	94
4.2.1. El tratamiento de etanol activa el inflamasoma NLRP3 en astrocitos in vitro: Papel del TLR4.....	94
4.2.2. Activación del complejo NLRP3/Casp1 en el cerebro de ratones con consumo crónico de alcohol.....	97
4.2.3. El TLR4 potencia la respuesta del complejo NLRP3/Casp1 en cerebro de animales tratados crónicamente con etanol: Estudio inmunohistoquímico.....	102
4.2.4. La activación del complejo NLRP3/ASC/Casp1 y el receptor TLR4 se asocian con infiltración leucocitaria y neuroinflamación.....	107
4.3 EL RECEPTOR TLR4 PARTICIPA EN LA DESMIELINIZACIÓN ASOCIADA AL ABUSO DE ALCOHOL EN EL CEREBRO.	115
4.3.1. El tratamiento crónico de etanol disminuye los niveles de las proteínas de la mielina; papel de los receptores TLR4.....	115
4.3.2. El abuso de alcohol altera la morfología de la mielina, reduce el número de fibras mielínicas y causa muerte neuronal.	118
4.3.3. El consumo crónico de alcohol induce la muerte de los oligodendrocitos y aumenta las células NG2+: implicación del receptor TLR4.	124
4.3.4. Cambios ultraestructurales y desestructuración de la mielina causados por consumo crónico de alcohol.	128
4.4. DETECCIÓN DE ALTERACIONES CEREBRALES INDUCIDAS POR EL CONSUMO DE ALCOHOL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE IMAGEN <i>IN VIVO</i>	131
4.4.1. Papel del receptor TLR4 en la inflamación producida por consumo crónico de alcohol a nivel cerebral y peritoneal.	131
4.4.2. Activación glial y muerte neuronal en el cerebro de animales con consumo crónico de alcohol.....	133
4.4.3. Cambios en la proteína proteolipídica (PLP) tras el consumo crónico de alcohol.....	135

4.5 LA RESPUESTA DE TLR4 AL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL SE ASOCIA CON CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL CEREBRO.....	137
4.5.1. El consumo de alcohol altera la acetilación de histonas en el cerebro. Papel de los receptores TLR4.....	137
5. DISCUSIÓN.....	141
5.1. PAPEL DEL RECEPTOR TLR4 EN EL DAÑO NEURAL Y NEUROINFLAMACIÓN PRODUCIDOS POR EL ALCOHOL. 143	
5.1.1. Papel de TLR4 en los efectos neuroinflamatorios que induce el alcohol.....	143
5.1.2. Papel de los co-receptores del TLR4, MD-2 y CD14, en los mecanismos que participan en las acciones del alcohol.....	147
5.1.3. Papel beneficioso y perjudicial de los TLR4 en la respuesta innata inmunitaria.....	148
5.2 EL INFLAMASOMA NLRP3 PARTICIPA EN LOS MECANISMOS NEUROINFLAMATORIOS ASOCIADOS CON EL ABUSO DE ALCOHOL.....	149
5.2.1. Papel de NLRP3 en los mecanismos neuroinflamatorios que causa el alcohol en el cerebro.....	149
5.2.2. El consumo crónico de alcohol induce infiltración de células inflamatorias en el cerebro.....	152
5.3. EL CONSUMO DE ALCOHOL INDUCE REDUCCIÓN DE MATERIA BLANCA Y DEGENERACIÓN AXONAL EN EL CEREBRO.....	153
5.4. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL AFECTA A LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.....	157
6. CONCLUSIONES.....	161
7. BIBLIOGRAFÍA.....	167

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

El sistema nervioso central (SNC), está formado por el encéfalo y la médula espinal (esquema 1A), los cuales están protegidos por envolturas óseas, que son el cráneo y la columna vertebral, respectivamente. Las meninges, son las capas de tejido conectivo que protegen los vasos sanguíneos, y están formadas por tres membranas, la duramadre, la piamadre y la aracnoides, que recubren el encéfalo y la médula espinal, y contienen el líquido cefalorraquídeo (LCR), un líquido transparente e incoloro que rellena las cavidades de los ventrículos (encéfalo) y del conducto endocondrial (médula espinal).



Esquema 1: Sistema nervioso central (A) y estructura del encéfalo (B). Imagen modificada de la librería de Ilustraciones Médicas A.D.A.M.

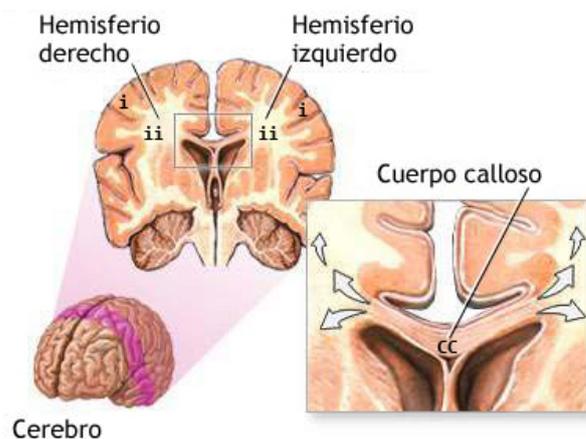
El LCR presenta muchas funciones, entre las cuales destacamos su actuación eliminando residuos, es un medio donde se intercambian sustancias, mantiene el equilibrio iónico, funciona como amortiguador mecánico, transporta oxígeno y glucosa desde la sangre a las neuronas, etc. Además, es un elemento importante en el diagnóstico de enfermedades neurológicas. Es un sistema complejo, en el que se reciben estímulos y se transmiten las respectivas respuestas de forma precisa a los distintos efectores. La médula espinal es un cilindro nervioso, de color blanco que se encuentra dentro de la columna vertebral, y cuya función esencial es

la conducción de la corriente nerviosa a través de los nervios entre el cerebro y la musculatura.

El encéfalo, lo conforman las siguientes partes: cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo, diencefalo (hipotálamo) y mesencéfalo (esquema 1B) y se considera la estructura central más importante del sistema nervioso, siendo su función principal, controlar todas las funciones del organismo.

1.1.1. El cerebro y componentes sensibles al alcohol.

El cerebro (esquema 2) es la parte más importante, constituido por (i) la sustancia gris (zona externa), que está formada por el cuerpo o soma de las neuronas, sus dendritas y por las fibras amielínicas, y (ii) la sustancia blanca (zona interna), formada principalmente por las prolongaciones nerviosas (dendritas y axones), cuya función es la conducción de la información, y por las fibras mielínicas, que le proporcionan su color característico.



Esquema 2: Corte coronal del cerebro. Se muestran los dos hemisferios cerebrales, donde distinguimos la sustancia gris (i), la sustancia blanca (ii), y el cuerpo calloso (CC). Imagen modificada de la librería de Ilustraciones Médicas A.D.A.M.

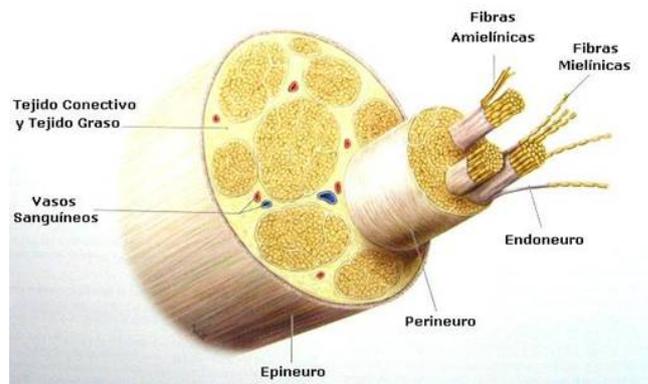
Asimismo, presenta una superficie con circunvoluciones y unos surcos, llamados cisuras, de las cuales destacamos las cisuras de Silvio y de Rolando. El cerebro está dividido en dos hemisferios, comunicados entre sí por una zona denominada cuerpo calloso (CC) (esquema 2).

El CC es un haz de la sustancia blanca, formado por fibras nerviosas que actúan de puente entre los dos hemisferios cerebrales y hace que trabajen de forma conjunta. Estas fibras callosas nacen de la corteza cerebral, a partir de grandes células piramidales que les dan origen. Otras fibras existentes, serían colaterales de las fibras de proyección de la corteza cerebral. De modo que cualquier alteración en el CC, se traduce en un problema neuropsicológico. Normalmente, el CC por ser una zona formada por sustancia blanca, puede presentar alteraciones debidas a una condición metabólica tóxica, como es el caso del alcohol durante el desarrollo (ej. Síndrome Alcohólico Fetal), infecciones prenatales, alteraciones genéticas (trisomía 8 y 18, síndromes de Andermann y de Arcadi), etc. Aunque también, en el cerebro adulto se producen alteraciones, sobre todo en aquellas enfermedades que conllevan a una desmielinización, como es la enfermedad de Marchiafava-Bignami (Arbelaez et al., 2003).

1.1.2. La sustancia blanca.

La sustancia blanca (esquema 2, ii) es una parte del SNC, que se encuentra formada por fibras nerviosas mielinizadas (cubiertas de mielina), las cuales contienen sobre todo muchos axones. De hecho, el axón es la parte de la neurona que se encarga de la transmisión sináptica entre las células nerviosas.

La mielina, es una lipoproteína que se encuentra formando una capa gruesa en forma de bicapas fosfolipídicas (esfingolípidos) concéntricas alrededor de los axones, permitiendo la transmisión del impulso nervioso. El esfingolípido, está formado por una cadena de alcohol llamado esfingol, formado por un ácido graso, fosfato y colina, y que además le confiere aislamiento (esquema 3).



Esquema 3: Fibras de mielina. Imagen adaptada de *Texto y Atlas de Anatomía Prometheus*, (volumen 3).

En el SNC, la mielina está formada por células especializadas de la glía denominadas oligodendrocitos, con muchas prolongaciones, que se enrollan alrededor de los axones de varias neuronas. En cambio, en el sistema nervioso periférico las vainas de mielina son producidas por las células de Schwann.

Para el correcto funcionamiento de la neurona, el axón debe estar recubierto por la vaina de mielina, pero esta puede dañarse dando lugar a graves trastornos del sistema nervioso, puesto que los impulsos eléctricos no son transmitidos, y esto hace que se active el sistema inmune innato del organismo.

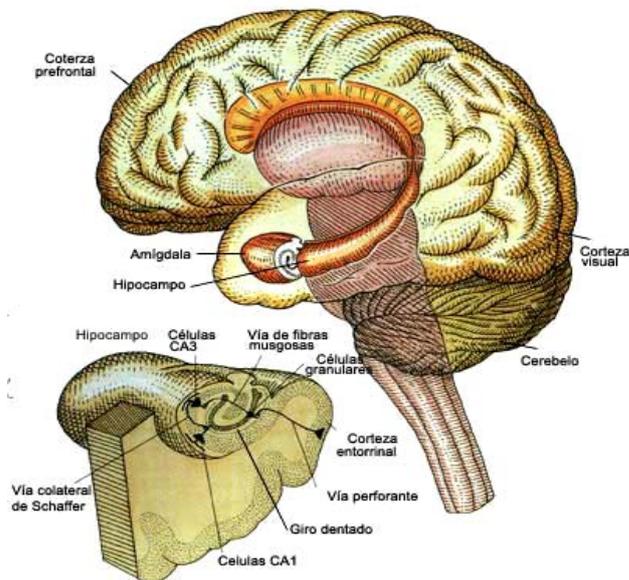
Las enfermedades desmielinizantes del SNC tienen un amplio espectro de presentación, difieren en sus hallazgos patológicos, clínica, tiempo de evolución, gravedad y respuesta al tratamiento (Lucchinetti et al., 2000). La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más estudiada. Las formas agudas de desmielinización del SNC han sido consideradas por algunos autores como variantes agresivas de la EM, sin embargo, existen evidencias patológicas y clínicas para considerarlas enfermedades independientes dentro del espectro de las enfermedades desmielinizantes (Hartung, 2001).

De hecho, los déficits y alteraciones en la mielina se encuentran normalmente asociados a trastornos neurodegenerativos hereditarios como son las leucodistrofias e incluso a enfermedades desmielinizantes, como hemos descrito anteriormente. Asimismo, el alcohol se considera uno de los componentes

neurotóxicos que puede producir pérdida de materia blanca en el cerebro (Krill et al., 1997; Wang et al., 2009) (véase apartado 1.4.2).

1.1.3. La corteza cerebral.

Otra de las zonas importantes de estudio a destacar entre las distintas partes del cerebro (esquema 4) es la corteza cerebral. Esta región cerebral está situada en la periferia del encéfalo, en ella se encuentra una lámina de sustancia gris formada por los somas neuronales cubriendo los hemisferios cerebrales, y cuyos núcleos se presentan en la zona de la sustancia blanca. La corteza cerebral como parte del SNC consiste en una mezcla de células nerviosas, fibras nerviosas, neuroglia y vasos sanguíneos.



Esquema 4: Partes del cerebro en corte transversal. Observamos la corteza prefrontal, el hipocampo (CA1 y CA3) y el cerebelo.

Las neuronas de la corteza, permiten determinar capas diferenciadas (Valverde, 2002), formadas por fibras nerviosas interconectadas que marcan la actividad neuronal. Específicamente, los estudios morfológicos han demostrado que

la sustancia gris del córtex está dividida en seis capas (esquema 5) superpuestas (isocórtex):

-Capa I: capa molecular o plexiforme, es la capa más superficial, formada por una red de escasas células nerviosas fusiformes, con orientación tangencial y mezclada con otros elementos de la neuroglía. Estas fibras, derivan de las dendritas de células piramidales y fusiformes, y sus axones de células estrelladas y de Martinotti. Otras fibras aferentes, se originan en el tálamo. Además, entre las fibras nerviosas se encuentran algunas células de Cajal.

-Capa II: capa granulosa externa o con pequeñas células piramidales y estrelladas, cuyas dendritas terminan en la capa molecular, pero sus axones se internan hacia capas más profundas.

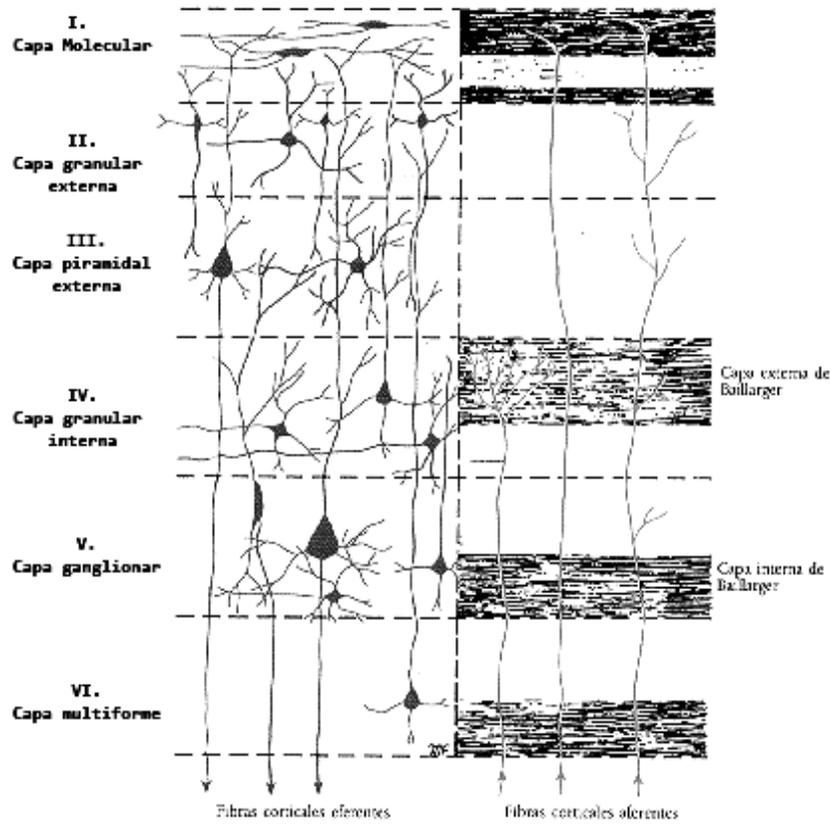
-Capa III: capa piramidal externa, que presenta células progresivamente de mayor tamaño hacia las capas más profundas, con aspecto periforme o piramidal. Sus dendritas pasan hasta la capa molecular y sus axones se extienden como fibras de proyección, asociación o comisurales en la sustancia blanca.

-Capa IV: capa granulosa interna, formada por células estrelladas de forma muy compactada. Presenta una concentración de fibras dispuestas horizontalmente conocidas como la banda externa de Baillarger.

-Capa V: capa ganglionar, conocida también por capa piramidal interna o de Betz, con células piramidales grandes y medianas (estrelladas y de Martinotti). Existen en esta capa, fibras dispuestas horizontalmente formando la banda interna de Baillarger.

-Capa VI: capa polimorfa o multiforme, que presenta numerosos elementos celulares, de distintas formas y volúmenes. Aunque la gran parte de estas

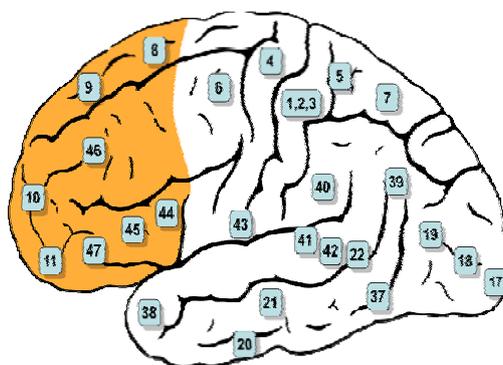
células son fusiformes, muchas son triangulares u ovoideas. Las células de Martinotti también son notables en esta capa, y existen muchas fibras nerviosas que entran en la sustancia blanca subyacente.



Esquema 5: División de las capas corticales en la corteza cerebral. Observamos la corteza cerebral, la cual se divide en 6 capas diferentes designadas por números romanos (I-VI), de la más externa a la capa más interna, respectivamente.

La corteza cerebral, es una estructura compleja, estructurada por varias áreas o zonas, clasificadas por Brodman en 1978 en 52 zonas, de acuerdo con la

función que desempeñaban (esquema 6). Entre estas zonas, merecen destacar la corteza prefrontal, córtex visual, córtex motor, corteza auditiva, corteza motora, etc.

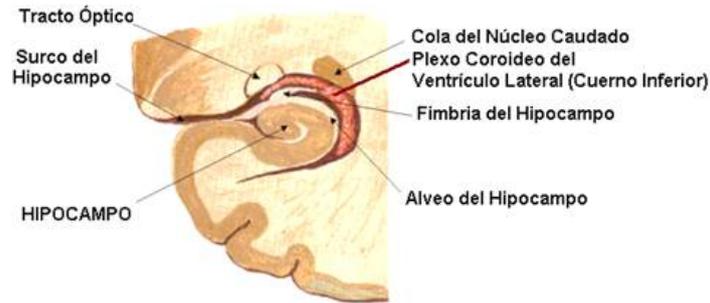


Esquema 6: Áreas del cerebro humano según la clasificación de Korbinian Brodman. Distinguímos la corteza prefrontal (color naranja) (Imagen tomada de Anatomía de Gray).

En los últimos años, se ha dado mucha relevancia a la corteza prefrontal por su papel en el control de las funciones ejecutivas, memoria de trabajo, atención selectiva, formación de conceptos y flexibilidad cognitiva. Alteraciones en la maduración de esta zona, se han relacionado con algunos trastornos psiquiátricos. De hecho, la corteza prefrontal es también muy vulnerable a los efectos tóxicos y conductuales asociados al consumo de alcohol (Abernathy et al., 2010).

1.1.4. El hipocampo.

El hipocampo, es una zona relacionada estrechamente con la corteza cerebral, la cual se ubica en el lóbulo temporal del cerebro (esquema 7). Esta zona resulta crucial para la memoria y el aprendizaje del individuo. Además, se encuentra cubierta por una capa de sustancia blanca que se llama alveo (esquema 7), que corresponde a fibras mielinizadas (axones de las células piramidales del hipocampo). Observando el corte transversal (esquema 4 y 7) podemos observar que el alveo se continúa con la fimbria (paquetes de células piramidales del hipocampo) que seguirá con los pilares del fórnix.



Esquema 7: Corte transversal del hipocampo. Se muestra el alveo y la fimbria. Imagen adaptada del Atlas de Anatomía de Netter.

El hipocampo, que se encuentra en estrecha comunicación con el córtex cerebral, forma parte de un sistema denominado formación hipocámpica. En este sistema, se incluye aparte del hipocampo, al giro dentado y el subículo, que en conjunto forman parte del sistema límbico.

El hipocampo, se puede dividir en diferentes estratos o áreas. Entre los primeros merecen destacar:

- Estrato polimorfo: es la zona situada hacia la superficie, formada por neuronas intrínsecas, caracterizadas por sus distintos tamaños y por sus axones dispuestos alrededor de las células piramidales del segundo estrato, en forma de canasto (células en canasto). Liberan GABA, inhibiendo a las neuronas piramidales.
- Estrato piramidal: capa formada por neuronas principales y extrínsecas, piramidales grandes y pequeñas. Se distinguen dos niveles, el denso, donde se encuentran las neuronas piramidales más pequeñas, y otro inferior con neuronas de mayor tamaño. Únicamente las neuronas de la capa piramidal, son las que envían sus prolongaciones axónicas fuera del hipocampo, siendo las únicas que responderán a los estímulos. Sus axones forman lo que conocemos como alveo y fimbria.
- Estrato molecular: formado principalmente por células de tipo granular, neuronas intrínsecas.

A su vez el hipocampo puede dividirse en cuatro áreas:

- CA1: situada entre el subículo y el hipocampo. Es un área muy sensible a la hipoxia, además de ser una de las más afectadas en enfermedades que afectan a la memoria a corto plazo, como son la Demencia senil, el Alzheimer, etc.
- CA2: área formada por dos capas celulares. Esta área, junto a la de CA3, se consideran medianamente sensibles a los procesos de hipoxia.
- CA3: área formada por células piramidales, ramificadas desde el giro dentado hasta el hipocampo, mediante sus dendritas, que poseen espinas dendríticas inervadas por terminales excitadoras, fibras *mossy*. Además, los axones de las células piramidales emiten llamadas colaterales de *Schaffer*, que van a inervar a las células piramidales de CA1. Por tanto, a mayor número de espinas dendríticas, mayor sinapsis y por tanto, un mejor aprendizaje.
- CA4: No presenta organización celular. Es el área más resistente a la hipoxia, de hecho se la considera una área de transición.

En resumen, el cerebro es uno de los dos órganos más complejos del ser humano, que todavía no hemos llegado a entender en la actualidad, y pequeños fallos en su estructura, procesos de señalización y funcionalidad de las células neurales pueden producir cambios cognitivos o en la conducta del individuo. Es por ello, por lo que la muerte neuronal que se asocia con muchas enfermedades neurodegenerativas, cursa con una gran variedad de síntomas como disfunciones en el movimiento, en el habla, en los procesos de memoria. etc.

Trabajos de los últimos años, indican una nueva función de las células del cerebro, como es la de responder ante la infección o el daño, regulando y coordinando la respuesta inmune innata. De hecho, la inflamación representa un factor crítico y esencial para muchas enfermedades del SNC, como las enfermedades neurodegenerativas entre las que se incluyen el Parkinson (Hunot and Hirsch, 2003), Alzheimer (Giovannini et al., 2003), Creutzfeldt-Jacob (Stoeck et al., 2006), Huntington (Wild et al., 2008), etc.

1. 2. SISTEMA INMUNITARIO.

El sistema inmunitario, está integrado por distintas líneas de defensa principales, como son la inmunidad innata (natural o inespecífica), sistema de defensa que nos permite controlar la mayor parte de los agentes patógenos que llegan al organismo; la inmunidad adquirida (adaptativa o específica), sistema que proporciona al organismo una respuesta específica frente a cada agente infeccioso, y que presenta memoria inmunológica específica, la cual evita que el mismo agente infeccioso provoque enfermedad en una segunda infección; y las barreras naturales, que lo protegen de la infección de los agentes patógenos.

1.2.1. Componentes del Sistema Inmunológico.

El Sistema Inmunológico se compone de distintas células y proteínas, y su función es reconocer y/o reaccionar frente agentes extraños.

(1) La primera línea de defensa está formada por barreras físico-mecánicas, químicas y biológicas que impiden en cierta medida que los microorganismos entren y/o se establezcan en el organismo.

(2) La segunda línea de defensa está formada por el sistema inmune innato y en este sistema se distinguen los siguientes componentes celulares (esquema 8):

A.-FAGOCITOS: Polimorfonucleares neutrófilos (PMN), serie blanca; Macrófagos: presentes en sangre y otros tejidos; Monocitos: que dan lugar a los macrófagos; y las Células no fagocíticas: eosinófilos, basófilos, etc. que se originan a partir de la médula ósea. Son células especializadas del sistema inmunológico cuya función primaria es ingerir o destruir microorganismos. Hay diferentes tipos de fagocitos;

- a) Leucocitos Polimorfonucleares (neutrófilos o granulocitos) propios de la sangre, que pueden migrar a sitios de infección en minutos. Este tipo celular aumenta durante una infección, tanto en la sangre periférica como en ciertos tejidos durante las primeras horas de la infección.
- b) Monocitos, son otro tipo de fagocitos de la sangre. Se encuentran recubriendo las paredes de las venas, y actúan para capturar microorganismos que pasan por la sangre. Cuando los monocitos salen del

fluido sanguíneo y entran en los tejidos, cambian de forma y tamaño para convertirse en Macrófagos.

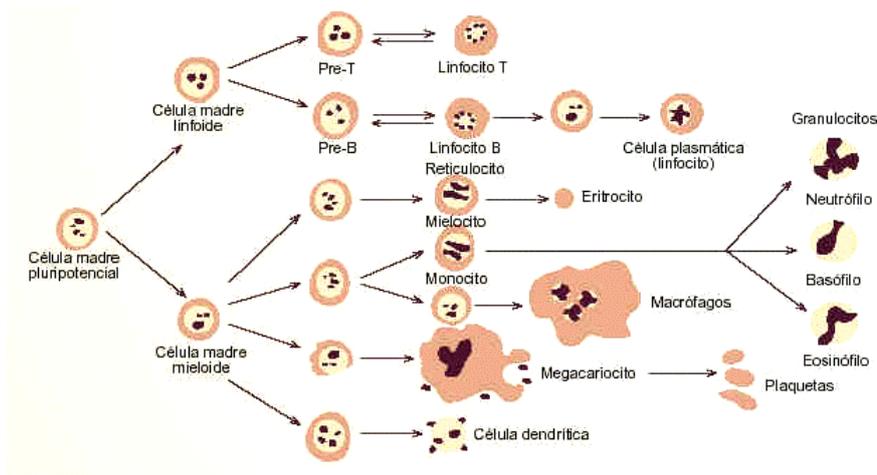
B.-COMPONENTES HUMORALES: péptidos y proteínas antimicrobianas (secretadas por los fagocitos).

C.-SISTEMA DEL COMPLEMENTO: está compuesto de 18 proteínas, que funcionan de manera ordenada e integrada, para ayudar en la defensa contra infecciones produciendo inflamación. Algunas de las proteínas del complemento las produce el hígado, y otras las producen los macrófagos. Para realizar sus funciones de protección, los componentes del complemento deben activarse. Las proteínas del complemento suelen cubrir al microorganismo para que puedan ser ingeridas con mayor facilidad por los fagocitos. Otros componentes del complemento mandan señales químicas para atraer fagocitos a los lugares de infección, etc.

(3) La tercera línea de defensa, el sistema inmune adquirido, exclusivo en vertebrados, y que se compone de los siguientes elementos (esquema 8):

A. Componentes celulares linfoides: son los Linfocitos B, los Linfocitos T y otras células denominadas NK (acrónimo del inglés *Natural Killer*), células dendríticas, etc. De hecho, los linfocitos, son los responsables de la respuesta inmune específica y constituyen el 25% de los leucocitos sanguíneos y el 99% de las células linfáticas. Se subdividen en;

- a) LINFOCITOS B (ó células B), se originan a partir de células madre en la médula ósea y son células especializadas del Sistema Inmunológico. Cuando se estimulan con un antígeno, responden madurando a otro tipo de células llamadas células plasmáticas, que producen anticuerpos (inmunoglobulinas o gammaglobulinas), moléculas proteicas altamente especializadas, cuya función principal es la destrucción del agente extraño.



Esquema 8: Principales componentes y origen de las células del Sistema Inmune.

- b) LINFOCITOS T (o células T), se desarrollan a partir de la médula ósea y en estado inmaduro migran al timo, donde se originan tras su maduración. Las funciones especializadas de éstos son el ataque directo a antígenos extraños como virus, hongos ó tejidos transplantados y la regulación del Sistema Inmunológico. Cada linfocito T reacciona con un antígeno específico. Se clasifican según su función: linfocitos T destructores ("killer" o "effector"), destruyen al microorganismo invasor protegiendo al organismo, 2) linfocitos T de ayuda ("helper"), hacen más efectiva la respuesta, ayudan a los linfocitos B a producir anticuerpos y a los linfocitos T destructores, en el ataque a sustancias extrañas, y 3) linfocitos T supresores ("suppressor") suprimen o apagan a los linfocitos T de ayuda. Sin esta supresión, el Sistema Inmunológico seguiría trabajando después de la infección, de modo que actúan en su regulación.
- c) CÉLULAS NK (o células asesinas naturales), comúnmente denominadas NK (acrónimo del inglés, *Natural Killer*) son un tipo de linfocito granuloso. Destruyen otras células a través del ataque a su membrana plasmática causando difusión de iones y agua hasta producir su lisis. Son inespecíficas y responden desde el primer momento.

B. Componentes humorales (secretados por los linfocitos): Anticuerpos, los cuales se dividen en función de su estructura química en 5 grandes clases: Inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM, IgE e IgD.

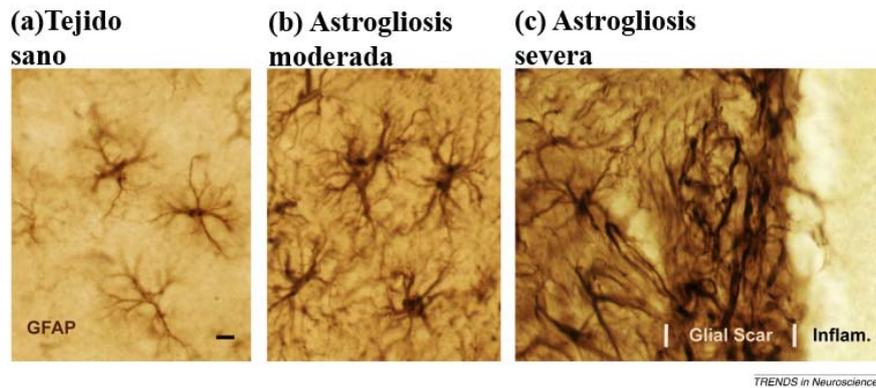
1.2.2. Sistema Inmune Innato.

Como ya se ha comentado, el sistema inmune innato, es el primer sistema de defensa que defiende al huésped de la infección causada por agentes externos, reconociendo y respondiendo a patógenos de forma genérica, no específica e inmediata contra la infección. El sistema inmunitario innato, es el sistema dominante de protección en la gran mayoría de los organismos (Litman et al., 2005), siendo la inflamación una de las primeras respuestas ante una infección (Kawai and Akira, 2006). Además, la respuesta del sistema inmune innato desempeña un papel crucial en el daño causado por diferentes enfermedades autoinmunes, y participa en otras como el cáncer, diabetes y daños cardiovasculares (Dalglish and O'Byrne, 2006; Tedgui and Mallat, 2006).

En el SNC, la inflamación producida por una infección, hemorragia o daño, suele asociarse con la activación del sistema inmune innato y se manifiesta por una estimulación de las células gliales residentes y por la presencia de infiltrados (Griffiths et al., 2007). Sabemos que las células gliales, en concreto la microglía y los astrocitos, son las responsables de las funciones inmunes en el cerebro, y juegan un importante papel en esta respuesta inflamatoria. La microglía, o macrófagos parenquimales del cerebro, se estimulan rápidamente en respuesta a cualquier tipo de lesión o infección, y varían su morfología adquiriendo una serie de funciones, como son la fagocitosis, aumento de moléculas de la membrana celular, producción y secreción de mediadores inflamatorios (Hanisch, 2002). Los astrocitos desempeñan también un papel muy importante en la respuesta inmune, contribuyendo al establecimiento y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BBB) (Prat et al., 2001) e incluso modulando la migración de monocitos y linfocitos a través de ésta (Weiss et al., 1998).

1.2.3. Papel de los astrocitos en la respuesta innata inmune.

Los astrocitos son células del SNC que responden de forma rápida ante un daño, y juegan un papel relevante en la regulación de la inflamación cerebral (Dietrich et al., 2005). En la mayoría de los casos, el daño cerebral viene acompañado de una hipertrofia astrocítica (esquema 9) que comúnmente se conoce como “astroglisis reactiva” (Ridet et al., 1997), la cual está vinculada a procesos inflamatorios (Crews et al., 2004).



Esquema 9: Imagen de fases de activación en astrocitos. Vemos a los astrocitos marcados con GFAP (marrón) en tejido sano (a), y diferentes grados de astroglisis reactiva, desde moderada (b) hasta severa, con formación de cicatrices gliales (Glial Scar)(c) tras un daño tisular. Imagen tomada de Michael V. Sofroniew, *TINS*, 2009.

Existen distintos puntos de vista, puesto que los fenómenos de astroglisis presentan una dualidad en su respuesta, puede ser un evento positivo que promueve la supervivencia neuronal y glial, a través de la producción de neurotrofinas y factores de crecimiento, o bien tiene una influencia relativamente negativa en la regeneración a través de la inhibición del crecimiento, la migración neuronal y glial (Crews et al., 2004; Sofroniew, 2009).

La estimulación de los astrocitos, en respuesta a un proceso neuropatológico, conlleva a la activación de la respuesta inmune innata, produciendo citoquinas, mediadores inflamatorios y radicales libres (ROS, NOS), así como a la expresión de moléculas del complejo de histocompatibilidad II (MHC II) (Dong and Benveniste, 2001). Esta reprogramación funcional, puede ser esencial para el mantenimiento de la homeostasis, y la regulación local de respuestas inflamatorias

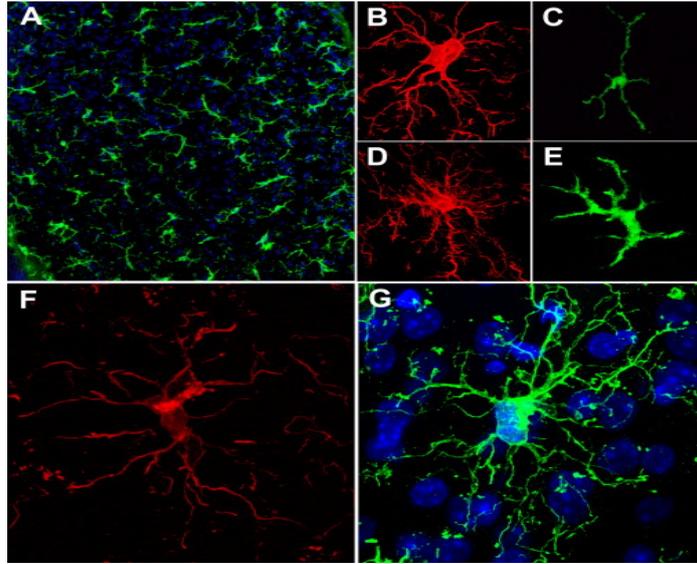
(Benveniste, 1998). De todas las citoquinas producidas, la IL-1 β , ha sido considerada como un mediador esencial en la respuesta inflamatoria del SNC. De hecho, la IL-1 β , se ha implicado en un gran número de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (Mrak and Griffin, 2005), y se sabe que en condiciones de daño cerebral, lesión o estrés, esta citoquina se produce de forma masiva en el cerebro (Patel et al., 2003). Aunque los mecanismos de estos efectos no están esclarecidos, parece que la IL-1 β es liberada inicialmente por células gliales, y a su vez, actúa sobre los astrocitos y la microglía para la producción de citoquinas adicionales y factores de crecimiento, promocionando la actividad inflamatoria en el cerebro (Benveniste, 1992; Merrill and Benveniste, 1996).

1.2.4. Papel de la microglía en la respuesta innata inmune.

La microglía está formada por células de pequeño tamaño que presentan prolongaciones cortas e irregulares y poseen capacidad fagocitaria.

Se encuentran diseminadas en la totalidad del SNC, además de ser uno de los tipos celulares responsables de la respuesta del sistema inmunitario en cerebro, actuando como fagocitos y eliminando tanto las estructuras dañadas en este sistema, como los virus y/o microorganismos. De hecho, las células de microglía se consideran los “macrófagos residentes del cerebro” ya que reacciona rápidamente frente al daño y la infección (Streit et al., 2004). Por tratarse de células mieloides innatas, su respuesta neuroinflamatoria recibe el nombre de respuesta innata del SNC (Nguyen et al., 2002; Hauwel et al., 2005).

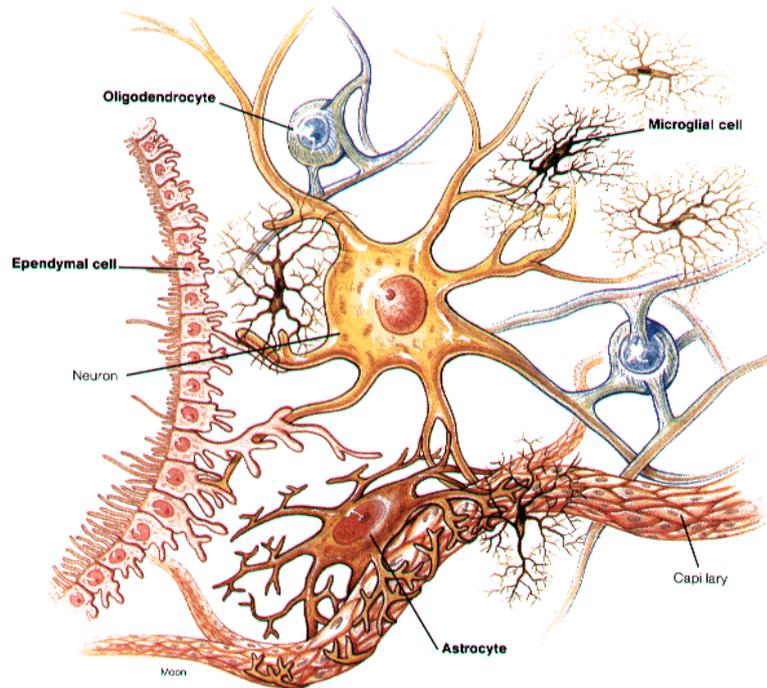
Cuando se activa la microglía, en algunas zonas del cerebro se produce una transformación desde un estado basal (arborescente) a un estado activo, donde suelen adquirir un aspecto ameboso o abastonado (esquema 10A). Asimismo, suelen actuar como células presentadoras de antígenos, además de segregar citoquinas e incluso quemoquinas, que regulan la infiltración leucocitaria (Ghirnikar et al., 1998; Stoll et al., 2002; Owens et al., 2005).



Esquema 10: Activación de microglía (verde) en el cerebro de ratón.
(Fotografía procedente de Rivest et al., 2009)

Estudios de los últimos años, han demostrado el papel funcional de la microglía en el cerebro, no sólo en condiciones normales, donde controlan la correcta homeóstasis del tejido, sino también en condiciones patológicas (Saijo and Glass, 2011). En respuesta a todas estas situaciones, las células de microglía, son capaces de detectar rápidamente señales o restos celulares y actuar de una manera específica en función del tipo de daño y/o alteración que se produzca.

La microglía, no sólo participa en la respuesta del sistema inmunitario innato, sino que también participa ante una situación de inmunidad adquirida, estableciendo comunicaciones entre las células microgliales y las células inmunes periféricas infiltradas (Graeber et al., 2011). De hecho, en la regulación de todos estos procesos, son múltiples las interconexiones celulares que se producen entre los distintos tipos y según la función de las células del SNC (esquema 11).



Esquema 11: Representación de las conexiones en los distintos tipos celulares en el sistema nervioso.

Además, diversos estudios indican que tanto la microglía como la astroglia, expresan unos receptores denominados Toll-like, que actúan de sensores en las infecciones y en el daño (Kielian et al., 2002; Jack et al., 2005).

1.3. RECEPTORES DEL SISTEMA INMUNITARIO INNATO.

El primer paso necesario para que el sistema inmunitario pueda desencadenar una respuesta rápida frente a una infección, es su reconocimiento. Este reconocimiento, se lleva a cabo a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), localizados en la membrana o en el citoplasma de las células del sistema inmunitario. Los PRRs permiten el reconocimiento directo de patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (PAMPs), y algunos pueden reconocer patrones moleculares endógenos en respuesta al daño tisular (DAMPs).

Entre los distintos PRRs, merecen destacar por su papel en diferentes

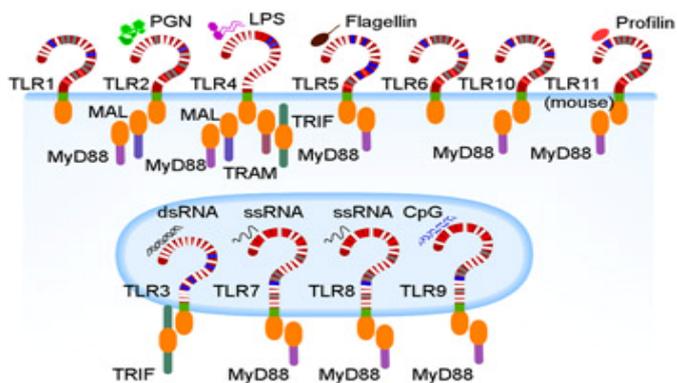
patologías, los receptores de membrana tipo Toll (TLRs) y los citoplásmicos tipo NLRs (Chen and Nunez, 2010).

1.3.1. Receptores tipo Toll.

En 1996, el descubrimiento de Hoffmann sobre el estudio de la mosca del vinagre (*Drosophila melanogaster*), permitió demostrar el papel del gen llamado Toll en la activación del sistema inmune (Lemaitre et al., 1996), puesto que las moscas con mutaciones en este gen eran incapaces de iniciar una defensa contra las infecciones de bacterias y hongos. A su vez, Taguchi T y colaboradores (1996) identificaron el primer receptor TLR en humanos (Taguchi et al., 1996), que denominaron TIL y que corresponde al TLR1. Sin embargo, fue en 1997, cuando Medhitov y Janeway identificaron una segunda molécula hToll, conocida actualmente como TLR4, y comprobaron que la estimulación de este receptor conllevaba a la activación de ciertos genes necesarios para la respuesta inmune, como el factor de transcripción kappa B (NF-kB) y la liberación de ciertas citoquinas proinflamatorias (Medzhitov et al., 1997).

Los receptores Toll, conocidos como *Toll-like receptors* (TLRs) están evolutivamente conservados, además de tener la capacidad de reconocer estructuras altamente conservadas, como son los llamados Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs). Los PAMPs incluyen varios componentes de la pared celular tales como lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos (PGN) y lipopéptidos; también flagelina, ADN de bacterias y ARNs viral (esquema 12).

La respuesta inflamatoria se asocia, en muchos casos, con la activación de la respuesta inmune innata, y específicamente con los TLRs, cuya relevancia radica en la regulación de la respuesta inmune durante procesos de infección y daño.



Esquema 12: Receptores TLR y sus respectivos ligandos.

Actualmente se han identificado 11 receptores TLRs en el genoma humano, mientras que en el genoma del ratón se han descrito 13 TLRs. Los TLRs 1-9 están conservados en las dos especies y todos ellos comparten un dominio citosólico común, denominado TIR (*Toll/interleukin-1 receptor*) (Dunne and O'Neill, 2003) (esquema13).

1.3.1.1. Patrones de expresión y ligandos de los receptores TLRs.

Los patrones de expresión de los TLRs difieren en función de la naturaleza del ligando que reconozcan (Dunne and O'Neill, 2003). Existen diferentes TLRs asociados a la membrana plasmática (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6) que suelen reconocer componentes de la pared celular, mientras que otros TLRs localizados en compartimentos intracelulares (ej. endosomas) (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) reconocen estructuras de ácidos nucleicos. En algunos casos, los TLRs forman heterodímeros, como el TLR2/TLR1 y TLR2/TLR6, y esta asociación le permite reconocer una amplia variedad de componentes microbianos entre los que se incluyen las lipoproteínas de diversos patógenos, peptidoglicanos de las bacterias gram-positivas, glicofosfatidil-inositol (GPI) anclado a parásitos que causan malaria, zimosan de los hongos y formas de LPS que difieren estructuralmente de las que reconoce el receptor TLR4.

El TLR4 es un receptor transmembrana, cuyo ligando específico es la endotoxina bacteriana LPS, además de que se ha demostrado que es capaz de reconocer otros ligandos endógenos como son el fibrinógeno, ácido hialurónico,

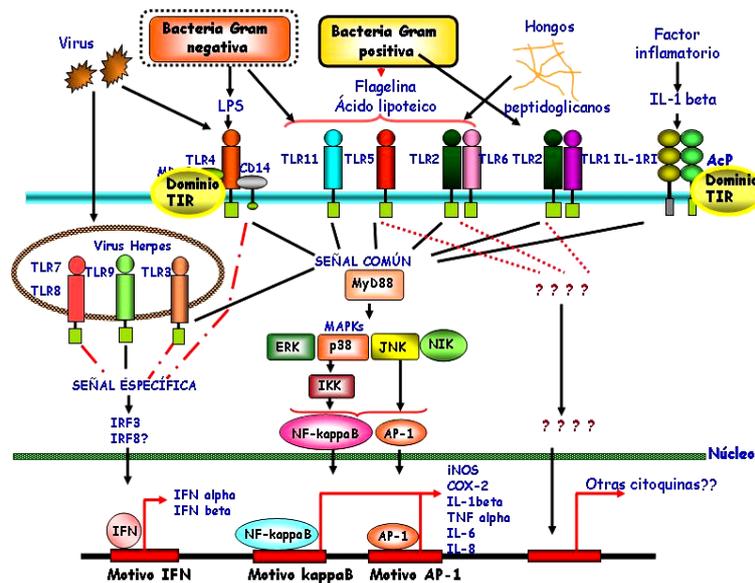
fibronectinas o las proteínas de choque térmico (HSP60 y HSP70) (Rifkin et al., 2005). El TLR5 reconoce la flagelina, componente monomérico de los flagelos bacterianos (Hayashi et al., 2001). Posee un codón de parada, polimorfismo en su dominio de unión al ligando, el cual se asocia comúnmente a la legionelosis (Hawn et al., 2003).

Entre los TLRs que reconocen ácidos nucleicos, el TLR3, TLR7 y TLR8 están implicados en infecciones virales (Hemmi et al., 2000; Alexopoulou et al., 2001; Jurk et al., 2002), mientras que el TLR9 es capaz de reconocer tanto el ADN viral como el bacteriano (Lund et al., 2003). El TLR3 se expresa principalmente en macrófagos, células dendríticas y epiteliales (Sen and Sarkar, 2005), e induce la expresión del IFN- β al reconocer el ARN de doble cadena. El TLR7 y TLR9 se expresa fundamentalmente en células dendríticas (plasmocitoides). El TLR7 reconoce el ARN de simple cadena, mientras que el TLR9 reconoce ADN con grupos CpG no metilados, ambos capaces de inducir la expresión del IFN- α , asociado a enfermedades autoinmunes como el lupus.

1.3.1.2. Activación de los receptores TLRs.

En 1998, Beutler descubrió que el TLR4 era el responsable de reconocer a ciertas endotoxinas bacterianas (lipopolisacáridos o LPS), dando lugar a una importante respuesta del sistema inmune (Poltorak et al., 1998).

Es interesante resaltar, que las vías de señalización intracelular que se activan con los TLRs, son similares a las que se generan por la unión de IL-1 β su receptor IL-1RI. De hecho, los receptores TLRs son miembros de una gran superfamilia que incluye los receptores de interleuquina-1 (IL-1Rs) (O'Neill and Dinarello, 2000; Akira and Takeda, 2004b) . Los TLRs e IL-1Rs tienen regiones conservadas de aproximadamente 200 aminoácidos en su parte citoplasmática, la región TIR (Akira and Takeda, 2004a) , mientras que la región extracelular de los TLRs e IL-1Rs difieren de forma marcada (Akira and Takeda, 2004a).



Esquema 13: Familia de los receptores TLRs y sus respectivos ligandos. Todos los TLRs presentan una región conservada de alrededor de 200 aminoácidos a nivel citoplasmático, conocido como dominio TIR. Vemos además, la cascada de señalización que desencadena tanto la activación de los TLRs como el IL-1RI.

Por tanto, la activación de los receptores TLRs e IL-1Rs conlleva a una señalización intracelular similar (esquema 13), que se inicia con el reclutamiento de diferentes proteínas adaptadoras que contienen el dominio TIR (O'Neill, 2003; Akira and Takeda, 2004b), entre las que se encuentra la MyD88 (factor de diferenciación mieloide 88). A esta vía se le denomina MyD88 dependiente. El proceso que tiene lugar es el siguiente: tras unirse el ligando, el receptor dimeriza, facilitando la unión de proteínas adaptadoras a través del dominio TIR. La proteína MyD88 recluta y activa a IRAK-4 (quinasa) 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, liberando las proteínas IRAK y se provoca la activación de las MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) y de la quinasa IKK que fosforila a IκB (inhibidor de κB), degradándose y liberando a NF-κB que se transloca al núcleo. Por tanto la activación de la vía MyD88-dependiente, conlleva a la activación de los factores de transcripción NF-κB

(implicado en la regulación de un gran número de genes involucrados en la respuesta inmune) y AP-1 (Esquema 13).

Sin embargo, aunque todos los TLRs se activan por la vía MyD88-dependiente, el TLR4 y el TLR3 pueden activar la vía que induce al interferón, que no se inicia con MyD88 y que se denomina la vía MyD88-independiente. El proceso en esta última vía es el siguiente: 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- β y que contiene el dominio TIR (TRIF). Este reclutamiento induce 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 β (IFN- β). El IFN- β activa a las proteínas STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) con la consiguiente activación de genes inducibles por interferón como IFN- β , IRF-1, IP-10 o VCAM-1 (Toshchakov et al., 2002; Takeda and Akira, 2004; Kawai and Akira, 2006).

En ambas vías, causan la inducción transcripcional de un conjunto de genes comunes (NF- κ B, AP-1 o IRFs), e inducen la secreción de proteínas proinflamatorias, como citoquinas (Takeda and Akira, 2004; McCoy and Tansey, 2008), proteasas y enzimas metabólicas, como son iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) y COX-2 (ciclo-oxigenasa-2) (Kracht and Saklatvala, 2002). Además, iNOS y COX-2 son importantes componentes en la cascada inflamatoria post-lesión en varios tipos de daños cerebrales (Heales et al., 1999; O'Banion, 1999; Yamada et al., 1999).

1.3.1.3. Unión del LPS al complejo TLR4/MD-2.

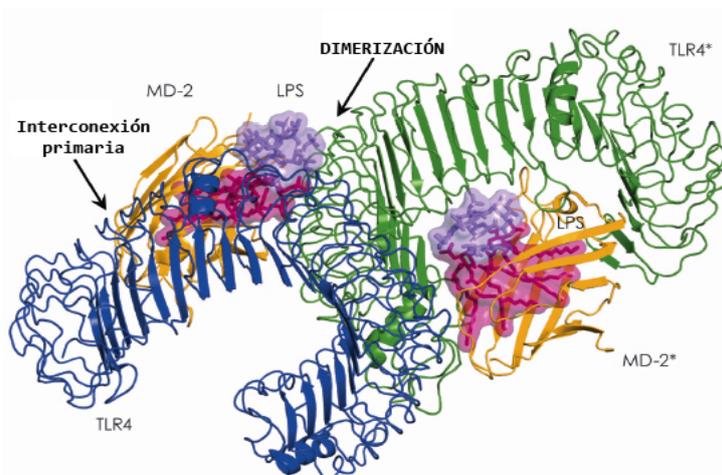
El TLR4 es entre todos los TLRs humanos identificados, el mejor caracterizado. Su ligando, como describió Beutler, es el lipopolisacárido o LPS, componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias gram negativas. El TLR4 es un receptor tipo I transmembrana que no reconoce directamente al LPS, sino que se debe unir primero a la proteína adaptadora MD-2 en su parte extracelular.

Estudios de modelización del complejo han permitido abordar interacciones entre el LPS y el MD-2 (Esquema 14). Un descubrimiento importante en la unión del

LPS al complejo TLR4/MD-2 fue el descubrimiento de que el MD-2 pertenecía al grupo de compuestos con capacidad de interactuar con los lípidos de membrana (Inohara and Nunez, 2002).

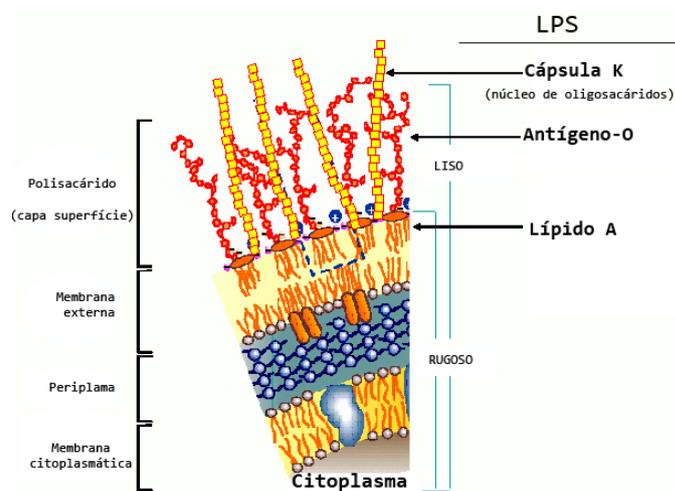
El plegamiento de las proteínas en estructura de hoja β , es similar a las que se forman por los dominios del anticuerpo de las inmunoglobulinas. Estudios de modelización, parecen indicar que el LPS presenta una unión mediada por una cadena de lípido A en el sitio hidrofóbico de MD-2 (Gangloff and Gay, 2004; Gruber et al., 2004).

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*, se estructura en tres regiones unidas covalentemente (ver esquema 15). 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).



Esquema 14: Estructura del complejo TLR4/MD-2/LPS. La interconexión primaria realizada entre TLR4/MD-2 ocurre antes de la unión del LPS, mientras que la dimerización ocurre tras la unión del LPS. (Imagen tomada de Gangloff and Gay, 2004; Park et al., 2009).

El lípido A, componente bioactivo de la toxicidad del LPS, está embebido en la membrana externa y es prácticamente idéntico en todas las bacterias gram-negativas. Está compuesto por dos moléculas de glucosamina unidas (disacárido) a un ácido graso mediante enlaces éster, y es esencial en la formación de la membrana externa de la bacteria. Se le une, en primer lugar un polisacárido nuclear, donde se distinguen dos regiones, la interna, formada por 2-ceto-3-desoxioctónico y la externa formada por variedad de hexosas y heptosas, conjuntamente con la unión del antígeno-O específico, formado por repetición de hasta 40 veces de unidades tri-, tetra- o pentasacarídicas ramificadas y el cual es altamente variable entre especies, además de ser responsable de la capacidad antigénica del LPS.



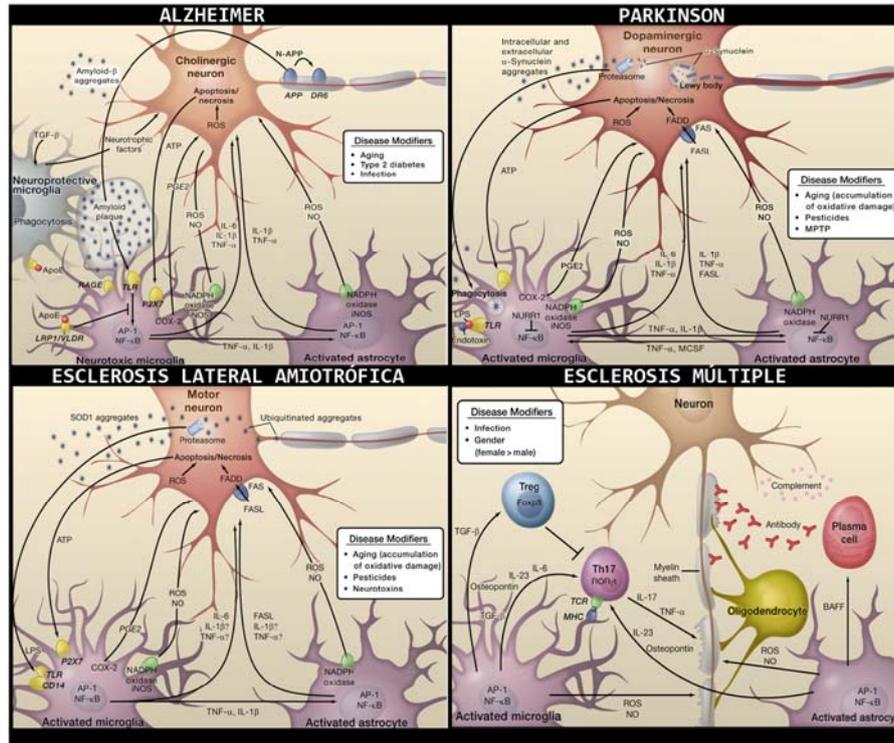
Esquema 15: Composición del LPS de Escherichia coli. Imagen modificada de *Journal of Endotoxin Research*, 7-3 (2001).

1.3.1.4. TLRs y neurodegeneración.

La respuesta ante un proceso de inflamación en el cerebro, se encuentra asociada normalmente con la activación de la inmunidad innata, donde los TLRs desempeñan un papel clave tanto en la regulación de la respuesta inmune frente a las infecciones como frente al daño en el SNC. La activación de estos TLRs, como hemos visto, activa al factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B) y la inducción de genes que codifican moléculas asociadas a la inflamación y citoquinas

(O'Neill, 2003; Akira and Takeda, 2004b). La mayoría de los TLRs, se expresan en las células gliales (Mishra et al., 2008) de cerebro y espina dorsal, y su expresión aumenta la neuroinflamación (Bsibsi et al., 2002). De hecho, mientras que la microglía expresa todos los TLRs (Lehnardt et al., 2003), los astrocitos y oligodendocitos sólo expresan algunos miembros de la familia, incluyendo los TLR4 (Tang et al., 2007; Blanco et al., 2008). Algunos estudios sugieren que las neuronas pueden expresar los TLR4 (Tang et al., 2007), pero su activación no desencadena las cascadas de señalización clásicas, como la vía de señalización NF- κ B y MAPK. La administración de LPS y estimulación de los receptores TLR4 inducen la activación de las células gliales, incrementa la expresión de los TLR4 y causa neuroinflamación y daño neuronal (Lehnardt et al., 2003). Trabajos de los últimos años indican, además, la participación de los TLRs en procesos neuroinflamatorios (Babcock et al., 2006; Chen et al., 2007), e incluso existen evidencias de que la eliminación de éstos receptores protege frente a la isquemia y daño cerebral en ratones (Cao et al., 2007; Caso et al., 2007; Tang et al., 2007).

Es importante señalar, que aunque un incremento transitorio de dicha respuesta inmune puede ser beneficiosa para paliar condiciones patogénicas (Rivest, 2003), una activación exacerbada de la inmunidad innata en procesos patológicos puede conllevar a procesos implicados en neurodegeneración (Campbell, 2004).



Esquema 16: Componentes neuroinflamatorios comunes a distintas enfermedades neurodegenerativas, donde participan los TLRs (Imágenes tomadas de Glass et al., Cell Review, 2010).

Estudios recientes han demostrado claramente que los receptores TLRs responden al daño tisular (DAMPs), y que la neuroinflamación y los TLRs participan en la patogénesis de distintas enfermedades neurodegenerativas y autoinmunes (Owens et al., 2005; Trendelenburg, 2008; Glass et al., 2010) (ver esquema 16).

Estos estudios indican que los TLRs, pueden actuar como iniciadores o potenciadores del daño neural. Así, el daño neural inicial que se origina en ciertas enfermedades neurodegenerativas, podría activar a los receptores TLRs, que a su vez, inducirían una liberación de compuestos inflamatorios que causarían neuroinflamación y daño neural asociado (Jin et al., 2008; Okun et al., 2009; Glass et al., 2010). Por tanto, la investigación de los mecanismos por los que los TLRs se

activan frente al daño, y las vías para bloquear esta neuroinflamación, es un tema que ha tomado relevancia en los últimos años y se mantiene activo en la actualidad.

1.3.2 Receptores NLRs: Inflamasoma.

Recientemente, además de los receptores TLRs, se han identificado otros sensores involucrados en la respuesta inmunológica innata, la familia de los receptores NLRs (del inglés, *Nucleotide-binding oligomerization domain like-receptors and Leucin-rich repeat*) o inflamasoma. Estas macromoléculas son sensores intracelulares de señales de peligro producidas en respuesta a componentes patogénicos o al estrés celular. Como sensores inmunológicos, las proteínas NLR no son únicas de humanos y ratones, ya que las plantas tienen proteínas similares denominadas proteínas R (Martinon et al., 2009). Esta familia de receptores, es un complejo de proteínas citosólicas que activan a la caspasa-1 y rompen la interleuquina-1beta (pro-IL-1 β) o pro-IL-1 a su forma activa IL-1, desencadenando un aumento en la liberación/secreción de las citoquinas IL-1 β e IL-18. Estas citoquinas, a través de su interacción con los receptores de membrana plasmática IL-1RI liberan mediadores inflamatorios, siendo un complejo importante para la defensa de las infecciones. Sin embargo, como ocurre con los TLRs, una activación excesiva puede causar inflamación.

Hay que destacar que tanto los TLRs (receptores de membrana) como los NLRs (receptores citoplásmicos), reconocen tanto los patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs como los patrones moleculares asociados al daño o DAMPs. El reconocimiento coordinado de ambos tipos de patrones es esencial para que se produzca una respuesta inmune. Además, existen algunos NLRs que necesitan la ayuda de otros PRRs para activar y secretar las principales citoquinas proinflamatorias, IL-1 e IL-18 (Dinarello, 2006). Asimismo, al igual que los TLRs, los macrófagos y los neutrófilos son los principales tipos celulares que expresan los receptores TLRs.

Finalmente, la importancia de los NLRs viene dada por su relación con ciertas enfermedades humanas. De hecho, la definición del inflamasoma, sus características estructurales y funcionales han permitido asociar mutaciones en genes de proteínas NLR particulares con enfermedades inflamatorias humanas

(Hoffman and Brydges, 2011), el vitíligo (mutación en el gen *NPL1*), síndrome Muckle-Wells (mutación en el gen *NPL3*), la enfermedad de Crohn, la gota, la asbestosis y la enfermedad de Alzheimer entre otras. El tratamiento de pacientes con algunas de estas enfermedades, con antagonistas de receptores IL-1 revierte los síntomas clínicos, sugiriendo una relación causa-efecto entre la producción de IL-1 β y la enfermedad. Más recientemente, se han encontrado evidencias de una estrecha relación entre inflamasomas y desórdenes metabólicos como obesidad y diabetes tipo 2 (Schroder et al., 2010; Nakahira et al., 2011; Wen et al., 2012).

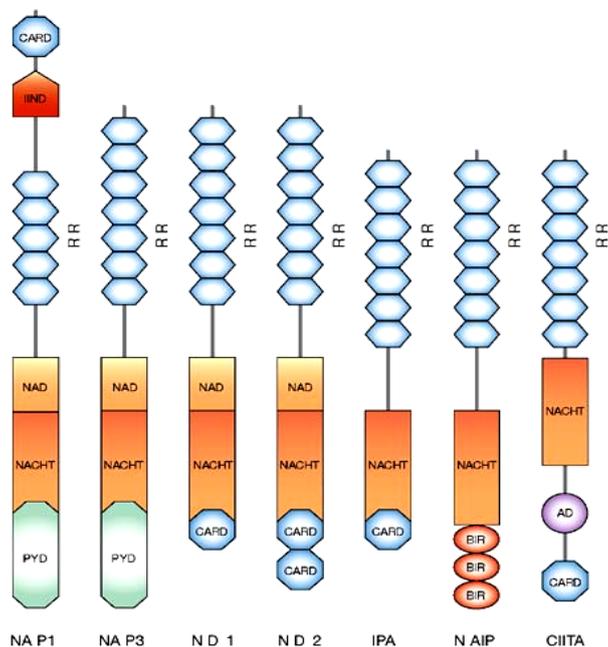
1.3.2.1. Receptores tipo NLR (CATERPILLERS, NOD-LRRs o NACHT-LRRs).

La familia de proteínas NLR consta de varios miembros, representados tanto en el genoma de ratones como en el de humanos. Generalmente, la mayoría de NLRs presentan una estructura tripartita (Franchi et al., 2009), formada por tres dominios (esquema 17): (1) un dominio central de enlazamiento de nucleótidos que media la oligomerización (llamado NOD o NACHT); (2) un dominio N terminal variable (CARD: dominio de reclutamiento de caspasa que define a la familia NLRC4 y NACHT; o PYD: dominio de pirinas que define a la familia NLRP; o BIR: repeticiones IAP de *Baculovirus*) (Inohara et al., 2005), y (3) un dominio C terminal rico en repeticiones de leucina (LRR), e importante en la detección de señales moleculares asociadas a patógenos (Martinon and Tschopp, 2007).

El complejo molecular de los NLR, está formado por unas proteínas asociadas al adaptador molecular ASC (del inglés: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) que determinan el complejo multiproteico conocido como inflammasoma. La molécula efectora del inflammasoma es una cisteína proteasa, caspasa-1, cuya activación promueve el procesamiento y secreción de citoquinas proinflamatorias fundamentales, tales como IL- β 1, IL-18 e IL-33. Esta caspasa a diferencia de otras tales como las caspasas 3, 8 y 9, no parece estar relacionada con los procesos de apoptosis, sin embargo, es crítica en procesos inflamatorios (Martinon et al., 2009; Schroder and Tschopp, 2010).

La primera proteína NLR que definió el concepto de inflammasoma en humanos fue la NLRP1; posteriormente, se han definido los inflamasomas NLRP3,

conocido como criopirina ó NALP3, y NLRC4 cuya activación requiere como estímulo un sistema de secreción bacteriano tipo III o IV, relacionado con la formación de poros en la membrana del hospedador.

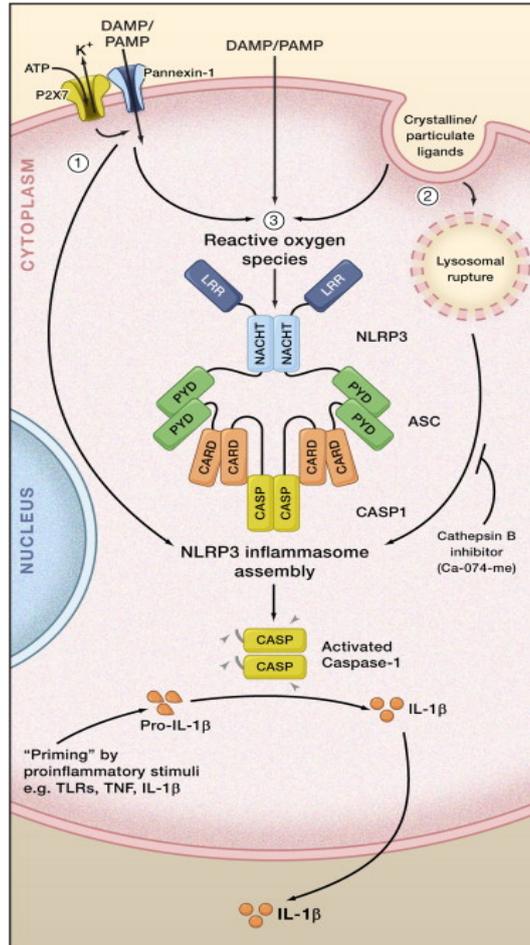


Esquema 17. Estructura y dominios de diferentes receptores NLRs. Representamos, el dominio de activación (AD); repeticiones IAP Baculovirus (BIR) proteína inhibidora apoptosis; dominio reclutamiento caspasa (CARD); transactivador del complejo MHCII (CIITA); dominio con función de búsqueda (FIIND); factor activación proteasa convirtiendo la IL-1 (IPAF); repeticiones ricas en leucina (LRR); dominio presente en NAIP, CIITA, HET-E (Sitio incompatible de la proteína de *Podospora anserine*) y proteína asociada a la telomerasa (NACHT); dominio asociado a NACHT (NAD); proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP); dominio NACHT (NALP); dominio LRR y dominio que contiene pirina (PYD). Procedente de LD Church et al, *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008 (Church et al., 2008).

Los mecanismos de activación de la caspasa-1 que desencadenan los diferentes tipos de inflamasomas son complejos, diversos y conllevan a la inducción y secreción de IL-1 β incluyendo, entre otros, la muerte celular programada por

procesos proinflamatorios (piroptosis) (Martinon et al., 2009; Schroder and Tschopp, 2010).

Diferentes miembros de la familia de los NLRs participan en el ensamblaje de complejos proteicos macromoleculares o inflamomas, tales como los NLRPs, que contienen el dominio PYD (NLRP 1-14) y los NLRs que contienen el dominio CARD (NLRs 1-5).



Esquema 18. Ensamblaje y activación de NLRP3. Los componentes del inflamoma pueden ser ensamblados sólo después que la criopirina NLRP3 se activa con la interacción de su dominio LRR con cristales (urato o pirofosfato de calcio dihidratado), ATP o alguna otra especie microbiana. El ensamblaje de los dominios conduce a la liberación de la caspasa-1 funcional, que activa a la IL-1 β a través de la pro-IL-1 β y esta desencadena la inflamación (Schroder and Tschopp, 2010).

Se ha demostrado que los receptores NLRP1, NLRP3 y NLRC4 son capaces de activarse y formar el complejo multiproteico que activa la caspasa-1, dando lugar a la secreción de la citoquina proinflamatoria interleukina-1 β (IL-1 β) y de la IL-18 (Schroder and Tschopp, 2010).

Entre los miembros que forman la familia de proteínas "NALP" (que incluye a la criopirina), el inflamasoma NALP1 y el inflamasoma NALP3 ó criopirina son los dos miembros mejor estudiados. Así, la estimulación de la criopirina da lugar a una serie de reacciones internas, que provocan en última instancia, la activación de la citoquina proinflamatoria interleukina-1 beta (IL-1 β) (esquema 18). Esta interleuquina, es secretada por los macrófagos y desencadena la inflamación. Se sabe que el inflamasoma, actúa como un sensor temprano capaz de detectar las señales de peligro que amenazan a la célula y fijar los mecanismos de defensa. Es importante resaltar, que el inflamasoma participa en la neuroinflamación generada ante un agente infeccioso y/o patogénico (van de Veerdonk et al., 2011), siendo el ensamblaje y la activación del inflamasoma un proceso crítico en los mecanismos de defensa del sistema inmunitario (Drenth and van der Meer, 2006). De hecho, se ha visto que su bloqueo mediante agonistas de IL-1Ra, es capaz de impedir en mayor o menor medida el daño causado por los infiltrados inflamatorios en el cerebro ante enfermedades infecciosas (Perret et al., 2011) o incluso neuroinflamatorias (Naik and Dixit, 2010).

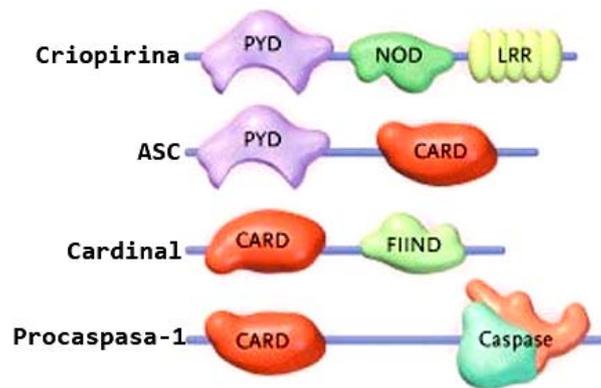
En la actualidad, existe un enorme interés en el estudio de los diferentes inflamasomas, por su mecanismo de acción y su relación con las ciertas patologías inflamatorias humanas, así como en desarrollar terapias apropiadas y conocer los mecanismos que modulan estos procesos inflamatorios.

1.3.2.2 El inflamasoma NLRP3.

La criopirina, o NALP3, es el principal componente central del inflamasoma 3. La proteína contiene tres dominios: un dominio pirina (PYD), un dominio de oligomerización del nucleósido (NOD) y un dominio de repeticiones ricas en leucina (LRR) (esquema 19). Otros componentes del inflamasoma, son el ASC (proteína que contiene un dominio de reclutamiento y activación de caspasas:

CARD), cardenal y procaspasa-1 (Drenth and van der Meer, 2006; Franchi et al., 2012).

Las mutaciones en los genes de NLRP3, han sido identificadas en síndromes de enfermedades autoinflamatorias, conocidos como CAPS, síndrome periódico asociado a criopirina (Neven et al., 2004; Jha and Ting, 2009). Además, en estudios recientes, se ha demostrado que la criopirina es capaz de regular la neuroinflamación y los procesos de desmielinización en enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple, EM (Jha et al., 2010).



Esquema 19: Dominios de la criopirina o NLRP (tomada de Drenth and van der Meer, 2006, Nature Review).

Sin embargo, mientras los TLRs e incluso los inflamomas pueden ser activados ante un proceso de infección, se desconoce cómo y qué tipo de participación e interacción ocurre durante un proceso inflamatorio e incluso qué interacciones ocurren durante la neuroinflamación debida a un daño neural (Martinon et al., 2009).

1. 4. ALCOHOL, SISTEMA INMUNITARIO Y DAÑO CEREBRAL.

El consumo excesivo de alcohol es la tercera causa prevenible de muerte en muchos países según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2008), además de asociarse con muchas enfermedades y factores desfavorables para la salud en consecuencia, como son la cirrosis hepática, diversos cánceres, adicción, daño cerebral, etc. Además, diferentes estudios demuestran que el alcohol afecta al sistema inmunitario, incrementando las infecciones en alcohólicos.

1.4.1. Efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario.

La respuesta del sistema inmune innato y del adquirido constituyen las principales líneas de defensa del organismo ante un agente extraño ó patógeno. Asimismo, en numerosos trabajos se ha demostrado que el etanol es capaz de alterar esta respuesta inmunitaria. De hecho, diferentes estudios clínicos demuestran que el abuso prolongado de alcohol incrementa el riesgo de padecer neumonías, puesto que disminuye la función de los macrófagos alveolares, sepsis (Moss et al., 2003; Joshi and Guidot, 2007; Witt, 2010), e incluso afecta negativamente en las infecciones sistémicas y/o retrovirales como hepatitis C ó el virus de la inmunodeficiencia humana (Szabo and Mandrekar, 2009; Szabo and Zakhari, 2011). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que el alcohol interacciona y desencadena una respuesta del sistema inmunitario permanecen sin elucidarse. Además, los efectos del alcohol sobre el sistema inmunitario son muy complejos, debido a la variabilidad de factores que participan son diversas, cómo pueden ser la dosis, tiempo de exposición (agudo ó crónico), tipo celular, etc. De hecho, algunos estudios en monocitos humanos demuestran que el tratamiento agudo de alcohol es capaz de alterar la respuesta neuroinflamatoria mediada por los TLR, en este caso tanto para TLR4 como para TLR8, inhibiendo la producción de citoquinas proinflamatorias (ej. TNF- α ó IL-1 β) (Mandrekar et al., 2002; Pang et al., 2011). 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 citoquinas y fosforilación de quinasas, tal que interfieren 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 el efecto inhibitorio del etanol (Oak et al., 2006).

Contrariamente al efecto supresor de dosis agudas de etanol sobre el sistema inmunitario innato, su consumo crónico parece provocar un proceso inflamatorio continuado y dañino. De hecho, se demostró claramente la implicación del sistema inmunitario innato en la patogénesis de la hepatopatía alcohólica (Albano, 2012), cuyos efectos se asocian con un aumento de citoquinas proinflamatorias en los niveles séricos de alcohólicos con daño hepático (Khoruts et al., 1991). En el hígado, 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). Sin embargo, la inmunidad adaptativa, recientemente se demostró a través de datos experimentales y clínicos, que ejerce un papel importante también, con la participación de los linfocitos Th-1 y Th-17 en la hepatopatía alcohólica (Albano, 2012). Además, la respuesta inmune innata que desencadena la activación de los receptores TLR4, junto con la producción de citoquinas proinflamatorias en el hígado, parece tener un papel esencial en la hepatopatía alcohólica (Uesugi et al., 2001; Szabo and Mandrekar, 2009), ya que la eliminación de estos receptores protege contra el daño que induce el alcohol en el hígado (Uesugi et al., 2001; Szabo and Mandrekar, 2009). Curiosamente, tanto dosis agudas como crónicas producen un efecto inhibitorio de la activación del receptor antiviral IFN tipo I (Pang et al., 2011).

Por otro lado, datos de nuestro laboratorio también demuestran que el consumo crónico de etanol en rata induce un aumento en los niveles de IL-1 β y TNF- α en suero, y es capaz de activar la vía IRAK/MAPK/NF- κ B en hígado y en 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).

1.4.2. Efectos del consumo de alcohol en el cerebro.

Uno de los órganos más sensibles a los efectos del consumo de alcohol es el cerebro. De hecho está claramente establecido que el consumo excesivo de alcohol se asocia con alteraciones estructurales y funcionales en el cerebro, con una pérdida progresiva de la masa cerebral. Además, el alcohol es una droga de abuso, ya que produce tolerancia, dependencia y adicción. De hecho, la tendencia actual de

consumo de alcohol durante fases muy tempranas (jóvenes/adolescentes), está ocasionando importantes problemas, no sólo en la toxicidad que tiene el alcohol en el cerebro en desarrollo del adolescente (Guerra and Pascual, 2010), sino también por el aumento del riesgo de tener problemas relacionados con el alcohol en fases tempranas.

Sin embargo, uno de los ejemplos más claros e importantes de la toxicidad del alcohol sobre el tejido neural se demuestra en el cerebro en desarrollo. Asimismo, está claramente establecido que el etanol es una de las sustancias neurotóxicas más importantes que causa alteraciones en el desarrollo cerebral, y su consumo y abuso por la madre gestante es una de las causas prevenibles fundamentales de retraso mental, alteraciones cognitivas y conductuales en el mundo occidental (Pediatrics, 2000). Las alteraciones más dramáticas se observan en niños con síndrome alcohólico fetal (Jones and Smith, 1973), que se caracterizan por presentar malformaciones faciales, retraso en el crecimiento pre- y postnatal, graves alteraciones neurológicas, cognitivas y conductuales (Guerra, 2009), además de malformaciones en otros órganos. Actualmente, para describir todo el abanico de efectos asociados a la exposición prenatal al alcohol se utiliza el término FASD o trastornos del espectro alcohólico fetal (Sokol et al., 2003). Mediante estudios de neuroimagen y experimentales, se ha demostrado que el alcohol altera la estructura y función de ciertas áreas cerebrales, siendo especialmente vulnerables el cuerpo calloso, la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo. En general, los defectos estructurales y funcionales que ocasiona el etanol durante el desarrollo del cerebro son irreversibles (Guerra, 2002; Guerra et al., 2009).

Referente al cerebro del adulto, estudios postmortem y de neuroimagen realizados en cerebros de alcohólicos, indican que el abuso de alcohol causa reducción de la masa cerebral (Kril and Halliday, 1999). Además, el grado de atrofia se correlaciona con la cantidad de alcohol ingerida durante toda su vida. La reducción de la masa cerebral y el volumen, son características que se suelen atribuir a la pérdida de materia blanca (Kril et al., 1997; Wang et al., 2009), principalmente en el lóbulo frontal (Sullivan and Pfefferbaum, 2005; Alexander-Kaufman et al., 2006), así como en el tálamo, cuerpo calloso (CC) y cerebelo entre otras (Rosenbloom et al., 2003; Matsushita and Higuchi, 2007). Todas estas disfunciones,

suelen exacerbarse e incluso presentar nuevas zonas de daño en individuos que tienen un déficit en tiamina (Harper, 2009). De hecho, la encefalopatía de Wernicke (WE, conocida como Síndrome de Wernicke-Korsakoff) y la psicosis de Korsakoff's (Martin et al., 2003) se producen como consecuencia de las deficiencias en tiamina asociadas con el consumo de alcohol.

Otros estudios, describen que existe una pérdida de neuronas en áreas específicas del cerebro de alcohólicos, como son el córtex cerebral, el hipotálamo y el cerebelo (Brooks, 2000; Lewohl et al., 2005). Asimismo, junto con la pérdida de neuronas y materia blanca, se han observado alteraciones y déficits en las células gliales del córtex prefrontal e hipocampo en los cerebros de alcohólicos (Korbo, 1999; Miguel-Hidalgo et al., 2002; Ikegami et al., 2003), e incluso mediante estudios de expresión génica en cerebros de alcohólicos, se han demostrado reducciones en genes que codifican proteínas de mielina (Ej. proteína proteolípídica ó PLP) y astrogliá (la proteína fibrilar ácida o GFAP) (Lewohl et al., 2005; Liu et al., 2006).

Sin embargo, a pesar de las observaciones que indican que el consumo y abuso de alcohol causa alteraciones importantes en cerebro, asociadas con disfunciones cognitivas y conductuales (Pfefferbaum, 2004; Harper and Matsumoto, 2005), se desconocen los mecanismos moleculares y/o celulares por los que el alcohol causa daño cerebral. De hecho, a lo largo de los años, se han postulado algunos mecanismos que no pueden explicar en su totalidad las alteraciones que causa el alcohol en el cerebro. Entre los mecanismos merecen destacar: 1) la participación de un aumento de glutamato y la excitotoxicidad con la generación de óxido nítrico (Crews et al., 2004), 2) la activación glial (*swelling*) responsable del edema cerebral (Ende et al., 2006; Sripathirathan et al., 2009) y 3) la producción de radicales libres y estrés oxidativo (Guerra et al., 1994; Montoliu et al., 2004; Guerra et al., 2005) con la consiguiente activación del factor NF- κ B (Zahr and Sullivan, 2008).

Estudios recientes, sugieren que el etanol es capaz de aumentar ciertas citoquinas proinflamatorias (He and Crews, 2008) en cerebro que causarían daño neural y neuroinflamación. Algunos autores, también sugieren que las citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleuquina 1 β (IL-

1 β), el ligando de Fas (FasL) y las quemoquinas entre otras, producidas por células polimorfonucleadas del sistema inmune (infiltrados) o por células gliales, participan en procesos de neuroinflamación en el SNC (van Loo et al., 2006). De hecho, se ha descrito que tratamientos agudos con etanol son capaces de activar la microglía e inducir elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias (ej. TNF- α) en cerebro e hígado. El efecto del etanol se potencia tras la administración de LPS, en cuyo caso se observa un aumento muy significativo de la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β) y la quemoquina MCP-1 en cerebro, hígado y suero así como citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 (Qin et al., 2008). Las citoquinas inflamatorias, a su vez, pueden activar a los astrocitos que podrían liberar más citoquinas (Saijo et al., 2009).

Datos de nuestro laboratorio demuestran que el consumo crónico de alcohol induce un aumento de citoquinas y mediadores inflamatorios en cerebro de rata que se asocian con una activación de las vías de señalización TLR4/IL-1RI. (Valles et al., 2004). Nuestros resultados también indican que el etanol, por si mismo, es capaz de activar las vías de señalización asociadas receptores TLR4/IL-1RI y la liberación de citoquinas tanto en cultivo primario de astrocitos (Blanco et al., 2005), como de microglía (Fernandez-Lizarbe et al., 2009). Además, el bloqueo de los receptores TLR4 con anticuerpos, elimina los efectos del etanol sobre la liberación de citoquinas y compuestos inflamatorios por las células gliales. Estos resultados sugieren que el etanol, a través de la activación de estos receptores en las células gliales podría promover la neuroinflamación (Blanco and Guerri, 2007).

Otros estudios utilizando células endoteliales, han sugerido que el alcohol podría inducir alteraciones en la barrera hematoencefálica (BBB) (Haorah et al., 2007), permitiendo la migración leucocitaria a través de la BBB, al igual que ocurre en algunas enfermedades inflamatorias (Popova, 2005), y dichos infiltrados promoverían la liberación de las citoquinas y procesos neuroinflamatorios. Sin embargo, actualmente no existen evidencias científicas de la presencia de infiltrados en cerebros de animales o humanos con consumo de alcohol.

Por otro lado, el alcohol es una sustancia adictiva, que produce tolerancia, dependencia y adicción. Aunque los mecanismos que causan estos procesos no están totalmente esclarecidos, si se ha demostrado que el alcohol actúa sobre varios

receptores de membrana diana a sus efectos, entre los que se incluyen, los receptores de glutamato NMDA (N-metil-D-Aspartato), los GABA_A, canales iónicos (ej. Canales de Ca²⁺ tipo L, de K⁺-GIRKs) y vías de señalización (Alfonso-Loeches and Guerri, 2011). Algunas de estas interacciones del alcohol con los receptores y canales iónicos, podrían explicar ciertos mecanismos de tolerancia y dependencia al alcohol. Por ejemplo, los efectos eufóricos e hipnóticos del etanol, parecen estar mediados por una activación en la neurotransmisión inhibitoria vía receptor del ácido γ -aminobutírico (GABA_A) que junto a la inhibición de los receptores excitadores para glutamato, N-metil-D-aspartato o NMDA causarían, dependiendo de la dosis de alcohol, euforia inicial, relajación, sedación y somnolencia. Sin embargo, el consumo crónico de alcohol induce cambios neuroadaptativos (tolerancia): aumenta el número de los receptores para glutamato NMDA, para compensar su inhibición por el etanol, y desensibiliza y/o disminuye la respuesta de los receptores GABA_A, modificando la composición de las subunidades del receptor GABA_A. Un aumento en la neurotransmisión excitatoria con respecto a la inhibitoria, puede contribuir a las manifestaciones del síndrome de privación alcohólica (dependencia). La hiperexcitabilidad en el síndrome de privación, puede contribuir al daño cerebral y a las alteraciones en la corteza prefrontal que se observan en alcohólicos. Al mismo tiempo, la adicción al alcohol parece estar mediada, como en otras drogas, a un aumento del sistema dopaminérgico mesolímbico. La privación o retirada del alcohol causa una notable reducción de dicha actividad dopaminérgica, hecho que podría participar en la búsqueda o ansia por reiniciar el consumo (Alfonso-Loeches and Guerri, 2011).

Estudios recientes, sugieren que en los procesos de ansiedad y los cambios en los sistemas dopaminérgico y glutamatérgico que ocurren durante el proceso que conlleva a la adicción al alcohol, contribuirían los mecanismos epigenéticos (Pascual et al., 2009). De hecho, existen datos que indican que las drogas de abuso y los estímulos ambientales, tales como el estrés, etc. alteran ciertos programas celulares en el genoma. Específicamente, los cambios epigenéticos modifican la estructura de la cromatina, en regiones promotoras específicas, produciendo cambios en la expresión génica y por tanto, contribuyendo a alteraciones y/o conductas adictivas (Liu et al., 2006). De modo que, las alteraciones cognitivas asociadas con

el daño que causa el consumo de alcohol, junto los posibles cambios epigenéticos serían factores importantes en el estudio de posibles mecanismos que regulasen los comportamientos adictivos a las drogas.

2. OBJETIVOS

Hemos demostrado que el alcohol causa neuroinflamación, y que estos efectos están mediados por una activación en la respuesta del sistema innato inmunitario y de los receptores TLR4 en células gliales. Nuestros resultados demuestran que el etanol, a través de su interacción con ciertos microdominios de membranas, balsas lipídicas o *lipid rafts*, es capaz de activar a los receptores TLR4 de astrocitos (Blanco et al., 2005) y de microglía en cultivo (Fernandez-Lizarbe et al., 2008), liberando mediadores inflamatorios, radicales libres y citoquinas proinflamatorias que producirían neuroinflamación. De hecho, cuando se bloquea a los receptores TLR4 con anticuerpos, se elimina la liberación de factores inflamatorios inducidos por el etanol en los cultivos de glía. Sin embargo, se desconoce si el consumo de alcohol es capaz de activar a las células gliales y causar neuroinflamación, daño cerebral y alteraciones en la mielina *in vivo*, si estos efectos están mediados por los TLR4 y si existen otros mecanismos que participen en la neuroinflamación inducida por el consumo de alcohol. Por tanto, la hipótesis que proponemos demostrar en este trabajo es:

“El consumo de alcohol, a través de la activación de los receptores TLR4 y del complejo molecular inflammasoma, induce neuroinflamación, alteraciones en la mielina, muerte neural e incluso neurodegeneración. Estos efectos, desencadenan cambios en la estructura de la cromatina y modificaciones en la acetilación de las histonas, dando lugar a alteraciones cognitivas y conductuales”.

Para abordar esta hipótesis, los objetivos planteados han sido los siguientes:

1) Evaluar en cultivo primario de astrocitos si el silenciamiento de los TLR4, elimina los efectos inflamatorios del etanol e investigar el papel de MD-2 y CD14 en dichos efectos.

2) Investigar si el consumo crónico de alcohol *in vivo* induce la señalización asociada a los TLR4 (MAPK/NF-kB), causa activación astrogliar y microglial, aumenta los niveles de citoquinas y de compuestos inflamatorios, así como de iNOS y COX-2, y si esto conlleva a la muerte neural.

3) Establecer si la eliminación de la función de los receptores TLR4 protege contra los daños inflamatorios que induce el alcohol en cerebro.

4) Determinar la importancia del complejo citosólico “inflammasoma” en la neuroinflamación que causa el consumo de alcohol, especialmente del inflammasoma NLRP3 que participa en distintas patologías autoinmunes con implicaciones de interés terapéutico.

5) Evaluar si existe una relación entre el daño neuroinflamatorio y activación de los receptores TLR4 inducido por el etanol con los procesos de desmielinización, reducción en la materia blanca y degeneración axonal que se observan tras un abuso de alcohol.

6) Comprobar si el consumo de alcohol favorece la migración celular de polimorfonucleados (leucocitos, neutrófilos, etc.) y macrófagos, formando lo que se conoce como “infiltrado inflamatorio”.

7) Establecer si la neuroinflamación y la neurodegeneración que induce el consumo crónico de alcohol, causa cambios epigenéticos en la acetilación de histonas y si estos cambios se correlacionan con alteraciones cognitivas y conductuales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

Para el desarrollo de este proyecto de investigación, los animales usados fueron ratas hembra Wistar (Harlan Ibérica, Barcelona), con un peso de 200-250 gr.; ratones silvestres (*wild type*, TLR4^{+/+}) de la cepa C57BL/6 (Harlan Ibérica S.L., Barcelona) y ratones TLR4 *knockout* (TLR4^{-/-} ó TLR4-KO) mutantes (con un fondo genético C57BL/6, cedidos por gentileza del Dr. S. Akira, Universidad de Osaka, Suita-Japón). Todos los animales se criaron y mantuvieron en condiciones SPF (zona barrera libre de gérmenes patógenos) con seguridad biológica y ciclos de luz/oscuridad (12/12h) controlados, temperatura (23±1°C), y humedad (60%). Las hembras fueron dispuestas en cajas independientes durante el período de gestación, con el fin de evitar periodos de estrés que pudiesen afectar a los resultados obtenidos. Todos los protocolos de experimentación con animales fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación con Animales del CIPF (CEBA), siguiendo las pautas establecidas por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea (86/609/ECC), por Real Decreto Ley 1201/2005.

3.2. CULTIVOS CELULARES.

Para los cultivos celulares, todo el material usado fue estéril, libre de patógenos.

Se utilizaron cultivos primarios de astrocitos tipo-I, procedentes de corteza cerebral de fetos de 21 días de ratas control, siguiendo procedimientos anteriormente descritos (Minana et al., 2001), y también de fetos P0 de ratones TLR4^{+/+} y deficientes para este receptor (TLR4-KO). Tras la extracción de los cerebros en condiciones estériles, las cortezas cerebrales se diseccionaron, eliminando las meninges y otras partes de cerebro, y las células se disgregaron mediante aspiración con una pipeta de 10 ml en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). El extracto celular se agitó en un vórtex a máxima velocidad durante un minuto y se filtró a través de una malla de nylon con un tamaño de poro de 80 µm, para eliminar los agregados celulares. El extracto se mezcló con DMEM que contenía 20% de suero bovino fetal (SBF), 1% de penicilina/estreptomina (concentración final: 1000 unidades/ml), 1% de fungizona (2.5µg/ml), 1% de glutamina (2mM) (Invitrogen-

Gibco) y 1000 mg/L de glucosa extra. El extracto celular se sembró en placas de 100 y 60 cm de diámetro, o sobre cubres de 16mm, para comprobar la eficiencia en los experimentos de transfección (ver apartado 3.5). Para los experimentos de nucleofección se usó Primocin™ (1:500, Amaxa Biosystems), antibiótico específico de protección del cultivo celular contra micoplasma. Los cultivos se crecieron en un incubador a 37°C, al 5% CO₂/95% aire. El medio de cultivo se cambió dos veces por semana, y tras siete días de crecimiento, el contenido de SBF se redujo al 10%. Los astrocitos se dejaron crecer hasta su confluencia y se usaron después de once días de cultivo.

La pureza de los cultivos se comprobó mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos contra las siguientes proteínas: GFAP o proteína ácida fibrilar de la glía (marcadora de células astrogliales), CD11b (marcador de microglía), MAP-2 (marcador neuronal) y MBP o proteína básica de mielina (marcador de oligodendroglía). En nuestras condiciones, el 99% de las células fueron GFAP positivas.

3.3. TRATAMIENTO DE ETANOL EN CULTIVOS CELULARES Y ADMINISTRACIÓN DE ETANOL A ANIMALES.

En este trabajo, usaremos indistintamente la palabra etanol o alcohol. Por un lado, el tratamiento que aplicamos es con etanol, debido a que es el componente principal en cualquier bebida alcohólica. Por otro lado, cuando hablamos de consumo, lo trataremos como “consumo o abuso de alcohol”.

3.3.1. Tratamiento de astrocitos con etanol.

Para analizar la respuesta inflamatoria del etanol en astrocitos, se usaron células diferenciadas en el día 11 de cultivo de astrocitos primarios (P11), a las que se les sustituyó el suero por una solución de albúmina bovina con una concentración de 1mg/ml en el medio, durante 12 horas. Trascurrido este tiempo, los astrocitos se estimularon *in vitro* con etanol (10 y 50 mM) o con LPS (50ng/mL) durante 0, 10 y 30 minutos a 37°C. Estos tiempos se habían establecido previamente en nuestro laboratorio (Vallés et al., 2004). Tras finalizar los tratamientos, el medio se separó, las células se lavaron con PBS (sin calcio ni magnesio), y tras rasparlas y separarlas

de la monocapa, la solución celular se centrifugó. El pellet celular se recogió y se congeló a -80°C para su posterior uso.

Todos los materiales usados fueron estériles, libres de patógenos o gérmenes. Además, para asegurarnos de que el etanol que estábamos usando no contenía trazas de LPS, se utilizó un método cromogénico para medir el posible contenido de LPS. Tras utilizar el procedimiento conocido como test del Lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium), los niveles de endotoxina que se detectaron en la solución de etanol fueron menores de $2,98 \times 10^{-3}$ pg/ml, concentración que está muy por debajo de la que se necesita para inducir activación astrogial en nuestras condiciones experimentales.

3.3.2. Bloqueo de CD14.

En algunos experimentos, y para bloquear al CD14, los astrocitos se incubaron con un medio que contenía 2 µg/ml de un anticuerpo monoclonal anti-CD14 (Santa Cruz Biotechnology). Este anticuerpo es capaz de bloquear la unión al receptor TLR4 de su ligando específico (Gong et al., 2002), el lipopolisacárido (LPS) e incluso bloquear la acción del etanol (ver resultados, Fig. 2). Para este experimento, las células se preincubaron con anti-CD14 durante 30 minutos antes y durante el tratamiento con etanol (50mM) o con LPS (50ng/ml). Se determinaron los niveles de ARNm de la interleuquina-1β (IL-1β) en astrocitos, 3 horas después de cada uno de los tratamientos.

Para eliminar los posibles efectos dependientes del LPS, en algunos experimentos, los astrocitos se trataron con 10µg/mL de un antagonista del LPS, el sulfato de polimixina B (PMBS, Sigma Aldrich). El PMBS es un antibiótico polipeptídico producido por el crecimiento de algunas cepas de *Bacillus polymyxa*, cuyo espectro de acción se limita a las bacterias Gram-negativas e impide la acción del LPS. Este compuesto fue añadido al medio de cultivo celular 15 min. antes y durante las 3 h. de tratamiento con LPS (50 ng/ml) o etanol (50 mM). Igualmente, se midieron los niveles del ARNm de la IL-1β, y se analizó si este antagonista era capaz de reducir el efecto provocado por el alcohol, y demostrar así que su efecto es independiente de LPS.

3.3.3. Administración crónica de etanol in vivo.

Para el tratamiento crónico de etanol, los ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO se mantuvieron durante 5 meses con una solución de etanol al 10% (v/v) disuelto en el agua de bebida suplementada con unas gotas de sacarina y dieta sólida *ad libitum*. Durante las dos primeras semanas, la concentración de etanol (%) en el agua de bebida se incremento progresivamente hasta alcanzar el 10% (v/v). La cantidad de alcohol consumida por día fue de 12.8±12.0 g etanol/kg. La ganancia de peso final durante los 5 meses de tratamiento fue similar tanto en ratones tratados como no tratados con etanol, y en ratones TLR4^{+/+} (C57BL/6) o mutantes TLR4-KO. Tanto la ingesta de comida como de bebida diaria por ratón fueron similares, en los tratados con etanol (comida: 3,26±0,91 g., bebida: 3,49±0,5 ml. de 10% etanol en agua) que en los no tratados (comida: 3,32±0,81 g. y bebida: 3,55±0,92 ml. de agua).

3.4. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE.

La concentración de etanol en sangre se determinó a primera hora de la mañana (8:00 h.) tomando la sangre de la vena coccígea, situada en la cola de los ratones. La sangre se recogió en tubos heparinizados y tras ser centrifugada, la concentración de alcohol se determinó mediante un kit espectrofotométrico (Sigma-Aldrich). Este kit se basa en la medida de NADH, que se produce por la reacción enzimática de 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. La medida de la producción de NADH a 340 nm es proporcional a la cantidad de alcohol presente en la muestra. Los niveles de alcohol en sangre que se obtuvieron fueron 125±20 mg/dl (rango, 87–140 mg/dl) y 122±13 mg/dl (rango, 98–135 mg/dl), para los ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO con tratamiento crónico de etanol, respectivamente.

3.5. TRANSFECCIONES.

Dada la dificultad de transfectar astrocitos primarios, usamos distintas técnicas y la única que funcionó eficientemente fue la de nucleofección. De modo que, todas las transfecciones fueron realizadas usando el Nucleofector II (Amaya Biosystems). Transfectamos pequeños RNA de interferencia (siRNA) que bloquean

diferentes exones del TLR4 de rata. Los siRNA se prepararon por la casa comercial Ambion (Austin, TX). También se usaron siRNAs para bloquear el CD14 y el MD-2, que se prepararon por la casa comercial Dharmacon (Dharmacon Research, Lafayette, CO). Para optimizar todo este proceso, usamos diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 h) y diferentes concentraciones de los silenciadores, siRNA-TLR4 (25, 100 y 600 nM) y para CD14 ó MD-2 (1,3 y 3,3 µg). Como control positivo para evaluar la eficiencia de transfección se usó el plásmido pmax-GFP suministrado por Amaxa. Bajo nuestras condiciones experimentales se obtuvo un 76% de eficiencia, con células positivas para GFP, según se evaluó mediante citometría de flujo (Cytomics FC500, Beckman Coulter, Izasa, Barcelona), y mediante inmunofluorescencia (ver Resultados, Fig. 1B).

Para la transfección de astrocitos de rata, las células se recogieron mediante tripsinización, y se transfectaron (2×10^6 millones de células) con los siguientes silenciadores: (1) 3,1 µg de siRNAs con dianas a TLR4 o con 30-50 nM de siRNA control negativo (secuencia aleatoria de 19 pares de bases con 3'dT overhangs, Ambion) y (2) con 1,3 µg de siRNAs con diana a CD14 o MD-2 o su control (ONTARGETplus SMART pool siRNA; Dharmacon Research). Para la transfección se uso un kit específico para astrocitos de rata, Nucleofector™ kit (VPG-1007, Amaxa Biosystems). Después de 48 horas (para el TLR4) o de 96 horas (para CD14 y MD-2) de la transfección, y tras incubar las células durante 24 horas sin suero, los astrocitos se estimularon con una concentración de 10 y 50 mM de etanol durante 10 y 30 minutos. Las células y/o sobrenadante se recogieron tras su estimulación para su posterior análisis mediante inmunoelectrotransferencia y/o PCR a tiempo real (RT-PCR).

3.6. AISLAMIENTO DE FRACCIONES SUBCELULARES DE ASTROCITOS.

Para el estudio de la activación nuclear de NF-κB y degradación de IκB-alpha en el citoplasma, fue necesaria la separación de ambas fracciones subcelulares. Para ello se utilizó un fraccionamiento subcelular siguiendo las recomendaciones y protocolo descrito por Ishida (Ishida et al., 2002).

Los astrocitos se lavaron con PBS, se centrifugaron y el precipitado obtenido se resuspendió en 200µl de solución I (Na₂HPO₄ 5mM pH7.4, NaCl 50mM, sacarosa 150mM, KCl 5mM, DTT 2mM, MgCl₂ 1mM, CaCl₂ 0.5mM y PMSF 0.1mM), a la que se le añadió un 0.2% de Nonidet P-40 fresco. Después de 5 min en hielo y vórtex suave, las células se centrifugaron a 1000xg durante 10min (4°C). El sobrenadante obtenido fue la fracción citoplasmática. El precipitado se resuspendió en 100µl de solución I sin NP-40. Esta suspensión se depositó suavemente sobre 1ml de solución II (Tris-HCl 2.5mM pH 7.4, NaCl 10mM, 30% sacarosa), generando un gradiente que se centrifugó a 1000xg durante 10min a 4°C para purificar los núcleos. Finalmente, la fracción nuclear se lisó con 40µl de solución III (Tris-HCl 50mM pH7.4, NaCl 300mM, Tritón X-100 0.5%) y se recogió por centrifugación a 10000xg durante 10min a 4°C, para su posterior uso.

3.7. OBTENCIÓN DE LISADOS DE CÉLULAS Y TEJIDOS.

Tanto las distintas áreas cerebrales obtenidas (corteza prefrontal y medial-frontal, estriado, cuerpo calloso e hipocampo) de ratones control y alcoholizados, como los astrocitos obtenidos *in vitro* tras los diferentes tratamientos, se lavaron con PBS frío, y se resuspendieron en tampón de lisis que contenía 1% NP-40, 20mM Tris-HCl pH8, 130mM NaCl, 10mM NaF, 10µg/ml aprotinina, 40µM leupeptina, 1mM DTT, 1mM Na₃VO₄, y 1mM PMSF (para corteza cerebral 0,3 ml/0,1 gr). Después de una incubación en hielo de 30min, la suspensión celular se centrifugó a 16000xg durante 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para la medida de proteínas totales y específicas mediante Western Blotting o inmunoelectrotransferencia.

3.8. INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

La concentración de proteína, tanto en las fracciones subcelulares como en los lisados celulares, se cuantificó mediante el procedimiento de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Para el análisis de proteínas concretas se utilizó la inmunoelectrotransferencia. Para ello se utilizaron geles de 1,5 mm de grosor con porcentajes de acrilamida (en el gel separador) entre el 7 y el 15% según el peso molecular de los fragmentos proteicos a resolver y adicionando dodecil sulfato sódico (SDS). Se mantuvo una relación

acrilamida: bis-acrilamida de 30:0,8 en todos los casos. A las muestras obtenidas se les añadió tampón de carga 6x (350mM Tris pH 6.8, 30% glicerol, 30% mercaptoetanol, 100gr/L SDS, 200mg/L azul de bromofenol) y se hirvieron durante 5 min. Para la electroforesis se utilizó un sistema Mini Protean de Bio-Rad en tampón: 6gr/L de Trizma base, 2.88 gr/L de glicina y 20 gr/L de SDS.

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

Las membranas se bloquearon durante 60 minutos en leche desnatada al 5% en TBS-Tween (TBS-T) 0.1% (Tris 20mM y NaCl 500mM pH 7.5) y se incubaron durante toda la noche a 4°C, en agitación, con los correspondientes anticuerpos primarios (ver Tabla 1). Las membranas se lavaron 3-4 veces con TBS-T 0.1% y se incubaron con los anticuerpos secundarios –anti IgG-conjugado con HRP (anti-ratón peroxidasa, 1:1000, Santa Cruz; anti-conejo peroxidasa, 1:20000, Sigma; anti-cabra peroxidasa, 1:10000, Sigma) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia utilizando ECL-Plus (Amersham) y se expusieron a films MXG de Kodak o Hyperfilm de Amersham.

En algunos casos, las membranas se reincubaron nuevamente con otros anticuerpos. Para ello, antes del bloqueo, las membranas se trataron con 200mM de glicina pH 2.5 y 0.4% de SDS durante 30 min., a temperatura ambiente, o bien, durante 1 hora a 60°C en una solución con SDS (2% SDS, 0.85% 2-ME, and 65 mM Tris-HCl (pH 6.8). Se usó anticuerpo monoclonal GAPDH, (1/3000, Chemicon) durante 2 horas como control de carga en la gran mayoría de proteínas.

Para la cuantificación de la intensidad de las bandas, estas se capturaron digitalmente con un escáner (EPSON DX 4800) y la intensidad de las mismas se cuantificó por densitometría mediante el uso del programa Alpha-Ease FC, programa de análisis de imagen versión Alpha Imager 2200 (Alpha Innotech Corporation). La intensidad relativa de cada proteína individualmente se expresó como el ratio entre su intensidad y control de carga GAPDH, o su control respectivo.

Tabla 1. Listado de los anticuerpos primarios utilizados.

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ORGANISMO	DILUCIÓN	PM (KDA)	CASA COMERCIAL
TLR4	cabra	1:50	89	Santa Cruz
CD14	conejo	1:100	55	Santa Cruz
MD-2	conejo	1 µg/mL	18	Abcam
IL-1RI	conejo	1:50	80	Pharmingen
MyD88	conejo	1:300	35	ProSciences
P-ERK	ratón	1:250	42-44	Santa Cruz
ERK1/2	conejo	1:500	42-44	Santa Cruz
p-IkB-alpha	conejo	1:100	40	Cell Signalling
NF-KB p65	conejo	1:50	65	Santa Cruz
Lamina A/C	conejo	1:1000	70	Cell Signaling.
COX-2	conejo	1:1000	72	Cayman Chem.
iNOS	conejo	1:100	130	Santa Cruz
Caspasa-3	conejo	1:1000	35-17	Cell Sign.
PLP	conejo	1:1000	26/30	Abcam
MBP	rata	1:1000	21/17	Abcam
CNPase	ratón	1:500	48	Abcam
MOG	conejo	1µg/mL	27	Abcam
MAG	conejo	1:5000	69/100	Abcam
NG2	conejo	1:100	270-300	Santa Cruz
NLRP3	conejo	1µg/mL	118	Abcam
ASC	cabra	1:500	24	Santa Cruz
Caspasa-1	conejo	1:100	45/10	Santa Cruz
IL-1β	conejo	1:200	31/17	Santa Cruz
IL-18	conejo	1:200	18	Santa Cruz
CD45	conejo	1:500	147	Abcam
CD68	cabra	1:200	78	Santa Cruz
MCP-1	ratón	5 µg/mL	11	Abcam
MPO	conejo	1µg/mL	84	Abcam
GAPDH	ratón	1:3000	36	Chemicon

3.9. PREPARACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL: ESTUDIO IN VIVO.

Para la preparación de los cerebros para las tinciones inmunohistoquímicas, los ratones se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) y como analgesia se usó fentanilo (0,05 mg/kg). Tras la anestesia, los animales se perfundieron transcardialmente con 0,9 % de solución salina fría o PBS 1X, seguido inmediatamente de una solución al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato 0.1M (Na₂HPO₄) (PB) (pH = 7.4) para la fijación del tejido a temperatura ambiente. Los cerebros se extrajeron, se fijaron con paraformaldehído (4%) durante toda la noche y se almacenaron con una solución crioprotectora del 30% de sacarosa a 4°C. Posteriormente, se realizaron secciones coronales de 35-40 µm de grosor mediante el uso de un criostato (Microm HM 505E), que se recogieron en portaobjetos recubiertos de polilisisina (Menzel-Gläser, Thermo Scientific, Alemania).

Otros animales se sacrificaron mediante dislocación cervical, y tras extraer el cerebro, se diseccionó la corteza prefrontal, la corteza medial-frontal, hipocampo y cerebelo, y las diferentes regiones se congelaron a -80°C hasta su posterior uso.

3.10. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las técnicas inmunohistoquímicas están basadas en la especificidad con la que reaccionan el antígeno y el anticuerpo, lo cual nos permite detectar e identificar una proteína específica si utilizamos un anticuerpo específico, que lo denominamos anticuerpo primario. En nuestro caso, algunas secciones cerebrales se trataron durante 15 min. con tampón citrato, pH 6.0, con el fin de exponer los antígenos (Jiao et al., 1999; Shi et al., 2001; Casella et al., 2004), facilitando la unión del anticuerpo.

3.10.1. Técnica de Inmunoperoxidasa indirecta: GFAP, CD11b, Caspasa-3, MBP, acetyl-histona H3 y h4.

Utilizamos el método de inmunodetección indirecta en dos etapas; (I) Las secciones cerebrales se incuban con el anticuerpo primario, el cual se une específicamente a su antígeno, y en (II) se aplica el anticuerpo secundario, el cual está unido covalentemente al enzima peroxidasa (enzima altamente oxidante, que

cataliza la formación del peróxido de hidrógeno), cuyo producto es revelado usando como sustrato la 3,3'-diaminobencidina (DAB), que cuando se oxida, forma un producto marrón insoluble. Con este segundo paso, se amplifica el resultado de la reacción, dándole una mayor sensibilidad al método de detección.

En nuestros estudios, las secciones cerebrales obtenidas de los animales perfundidos, se mantuvieron a temperatura ambiente unos minutos y se lavaron con PBS 1X. Posteriormente, y para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena, las secciones cerebrales se incubaron con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 15 minutos. Las secciones se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente (5% suero de cabra en PBS/T 0.1%) y posteriormente fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios; conejo policlonal anti-GFAP (1/100, marcador de astrocitos, Sigma Aldrich), rata monoclonal anti-CD11b (1/350, marcador de microglía activada, Abcam), conejo policlonal anti-Caspasa-3 (1/100, marcador de apoptosis, Cell Signalling), rata monoclonal anti-MBP (1/1000, Abcam), conejo policlonal anti-acetyl-histona H3 (Lys9) (1/50, Cell Signalling- Izasa, Barcelona, Spain) y anti-acetyl-histona H4 (Lys12) (1/50, Cell Signalling). Tras los lavados con TBS-1X, las secciones se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios biotinilados (contra conejo: 1/1000, Sigma Aldrich y contra rata: 1/200, Vector Laboratories Inc.). Finalmente se aplicó el método de avidina-biotina peroxidasa (ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para ello se usó como sustrato revelador DAB (SIGMA FAST™ 3,3'-Diaminobenzidine, Sigma Aldrich, USA) a una concentración de 0,7mg/ml (Sigma Aldrich, USA), o bien, se usó DAB-Níquel, produciendo un precipitado marrón o negro, respectivamente, de modo que permite una detección altamente específica de la proteína en el tejido. Los controles negativos se obtuvieron omitiendo el anticuerpo primario en todos los casos. Algunas secciones, tras deshidratar las muestras en concentraciones crecientes de alcohol (50-100%) seguidas de inmersión en xilol, se incubaron con tinción nuclear de hematoxilina (Sigma Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante y se montaron en el cubre usando el medio de montaje DPX (Fluka Analytical, Alemania). Las tinciones se visualizaron y grabaron digitalmente mediante una

cámara (modelo DFC-480, Leica Microsystems) en un microscopio Leica (modelo DM-6000B, Leica Microsystems).

La inmunoreactividad de los anticuerpos usados (CD11b, GFAP, Caspasa-3, MBP, acetyl-histona H3 y acetyl-histona H4) se cuantificó mediante el uso del programa de análisis *Meta-Imaging Series 7.0*. La cuantificación se realizó en las secciones de cortex cerebral de los animales no-tratados (control) y tratados con etanol. Se midió el porcentaje de tinción positiva relativo sobre el área total del tejido analizado tanto para CD11b, GFAP, Caspasa-3, MBP y acetyl-histona H3 y H4. Los resultados se expresaron como incremento de señal sobre los controles. Se midieron de 15 a 20 campos de corteza cerebral tomados al azar y se usaron un mínimo de 3 animales por grupo analizado.

Para la cuantificación de las fibras de mielina MBP positivas, se utilizó una modificación al método del disector óptico descrito por Reed, usando el principio imparcial del disector tridimensional (Reed and Howard, 1998). Las imágenes se tomaron con un microscopio Nikon *Ti-80*. Los análisis de las fibras se analizaron mediante medidas de densidad óptica (proceso de imagen binaria de negro y blanco), obteniendo el porcentaje de fibras positivas por campo analizado. Se seleccionaron ocho áreas al azar por cada animal, y un mínimo de 3 animales por grupo. Para este procedimiento se utilizó el programa Image J 1.42 (NIH).

3.10.2. Marcaje de IBA-1⁺ con la técnica de inmunoperoxidasa: análisis de la transformación microglial.

Los ratones se perfundieron según se describe en el apartado 3.9 (Preparación del Tejido Cerebral: Estudio *In Vivo*) y las secciones fueron criopreservadas hasta su uso. Para la detección iba-1 (marcador microglía), las secciones de cortes se lavaron con tampón PBS, 3 veces durante 5 minutos y se incubaron con tampón citrato descrito anteriormente para exponer sus antígenos. Posteriormente, las secciones se lavaron e incubaron con una solución al 3% de metanol y peróxido de hidrógeno durante 10 minutos, con el fin de bloquear la peroxidasa endógena. A continuación, las posibles uniones no específicas de los anticuerpos primarios y secundarios se previnieron mediante la incubación de los cortes en la solución de bloqueo compuesta por suero de cabra (especie animal en la

que se ha producido el anticuerpo secundario) durante 1 hora con una solución al 5% de suero de cabra en PBS/T (0.1%). Posteriormente, las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal anti-iba-1 (2 µg/mL, Wako-Chem). Al día siguiente, las preparaciones se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo (1/500, Vector Laboratories Inc.). Siguiendo el procedimiento, se aplicó el método de avidina-biotina-peroxidasa (ABC kit, Vector Laboratories Burlingame, CA) usando como sustrato la 3,3'-diaminobenzidina (DAB) a una concentración de 0,7mg/ml (Sigma Aldrich, USA). Estas tinciones producen un precipitado marrón que permite una detección específica de la proteína en el tejido. Para el control negativo, se omitió el anticuerpo primario. Las secciones cerebrales, tras deshidratarlas, usando concentraciones crecientes de alcohol (50%-100%), se lavaron con xileno durante al menos 10 minutos, y se montaron con un medio no acuoso de montaje, DPX (Fluka Analytical, Germany). Una vez secas las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss Axioskop 2 y las imágenes se analizaron con un programa de análisis de imagen (Leica Qwin).

3.10.3. Cuantificación de la activación de la microglía: Sistema de Anillos.

Tras realizar fotos a 100X de la microglía marcada con el anticuerpo anti-iba-1 con un microscopio Zeiss Axioskop, cada imagen se fotografió 3 veces en 3 planos diferentes, con el fin de captar la máxima amplitud de la célula en los 3 planos x, y, z. En cada grupo de estudio, se emplearon de 3-6 ratones por grupo, se cogieron unos 3 cortes por cada ratón y 10 células por corte. En total se analizaron unas 32 células por ratón y cada célula por triplicado. Para el montaje de las 3 imágenes obtenidas para cada célula, se usaron principalmente 2 programas, el Adobe PhotosShop y el Corel Painter, siendo la imagen final la utilizada para la cuantificación de la activación de la microglía. Cuando la microglía está activada se observa una célula en forma ameboide, con escasas ramificaciones (Nakajima and Kohsaka, 2001; Ransohoff and Perry, 2009). Sin embargo, cuando la microglía no está activada, presentaba varias ramificaciones, algunas bastantes prolongadas y extendidas (Ransohoff and Perry, 2009; Rodrigo et al., 2010).

El sistema de anillos, permite cuantificar el grado de activación de la microglía. Consiste en superponer sobre la imagen de la célula teñida con iba-1 una plantilla con 5 anillos concéntricos, y contando desde el anillo 1, el más pequeño, hasta llegar al anillo 6. LA suma de las intersecciones de los 6 anillos, nos dará el total de intersecciones por cada una de las células. Sumando el resultado de cada una de las 32 células, obtenemos un resultado final por animal. De modo que a menos número de intersecciones, mayor activación presentará la microglía, y viceversa (Gonzalez-Perez et al., 2002).

3.10.4. Tinciones de Nissl y Luxol Fast Blue (LFB).

Para realizar las tinciones, y puesto que eran muestras de tejido congelado, realizamos previamente un primer paso conocido como *de-fatting step*, con el cual deshidratamos las muestras y se reduce el fondo inespecífico en la tinción. De este modo, las secciones cerebrales se incubaron en una solución 1:1 de alcohol/cloroformo durante toda la noche. Posteriormente, las secciones se rehidrataron siguiendo un gradiente decreciente de alcoholes (100-50%) hasta llegar al agua destilada. Se procedió a realizar 2 tipos de tinciones:

3.10.4.1. Tinción Luxol Fast Blue (LFB).

Es un método sensible para la detección de mielina madura (Irving et al., 2001), el cual nos permite detectar procesos de desmielinización en el tejido estudiado. Para esta tinción, las secciones cerebrales se deshidrataron hasta llegar a un 95% de alcohol y se incubaron en 0,1% de la solución LFB (Sigma, St. Louis MO, USA) durante 2 horas a 60°C (podría dejarse toda la noche, pero sin exceder las 16 horas). Posteriormente, las secciones se lavaron con etanol 95%, en agua destilada y 0.05% de carbonato de litio. Una vez que se alcanzó la intensidad apropiada para analizar la tinción de LFB, las secciones se lavaron con agua destilada, alcohol del 70 % y posteriormente, se incubaron con 0.25% de violeta de cresilo (Sigma, St. Louis MO, USA). En esta tinción se puede observar tanto la mielina como los fosfolípidos, que aparecen de un color azul verdoso, al igual que las neuronas se tiñen de color violeta.

3.10.4.2. Tinción de Nissl.

Esta tinción tiñe el cuerpo de la célula, específicamente su retículo endoplasmático. Los cuerpos de Nissl (gránulos) son acumulaciones basófilas que se encuentran en el citoplasma de las células nerviosas. En esta tinción, se usan colorantes básicos, como es el violeta de cresilo, que tiñe el ARN en color azul, utilizado normalmente para resaltar las características estructurales importantes de las neuronas.

En nuestro caso, las secciones se incubaron en 0.1% de violeta de cresilo durante 5-10 min, se lavaron con agua destilada y con una solución de alcohol etílico al 95%. Las muestras se deshidrataron en distintos pases de alcohol al 100%, seguidos de un aclarado con xilol.

Todas las secciones, una vez deshidratadas, se montaron con medio de montaje no acuoso, DPX (Fluka Analytical, Germany). En ambas tinciones, Nissl y LFB, las imágenes se visualizaron y se grabaron digitalmente mediante una cámara acoplada a un microscopio Zeiss Axioskop, y se usó un programa de análisis de imagen llamado Meta-Imaging Series 7.0. La cuantificación se realizó mediante la medida de las áreas de tinción positiva (de LFB ó Nissl) respecto al área total de tejido (CC, corteza cerebral, o hipocampo), de ratones no tratados o tratados con etanol crónicamente. Aproximadamente, se analizaron 10-12 campos/área, de al menos 4-5 secciones cerebrales, y un mínimo de 3 animales/grupo.

3.10.5. Medida de Degeneración neuronal: Técnica de FluoroJade B (FJB).

El Fluoro-Jade B es un fluorocromo polianiónico derivado de la fluoresceína, que se utiliza como marcador de alta afinidad en la detección de la degeneración neuronal en el sistema nervioso central (SNC). En nuestro caso realizamos la tinción siguiendo el procedimiento descrito por Schmued y Hopkins (Schmued and Hopkins, 2000). En concreto, las secciones cerebrales se incubaron en una solución de NaOH (1%) en etanol (80%), durante 5 min., las secciones se rehidrataron en soluciones decrecientes en su graduación de alcoholes hasta llegar al agua destilada. Posteriormente las secciones se incubaron en una solución de 0.06% de permanganato potásico durante 10 min. en agitación, se lavaron con agua

destilada durante 2 min. y se incubaron durante 20 min. en una solución 0.0004% de fluoro-Jade B (FJB) (HistoChem Inc., Jefferson, AR) y yoduro de propidio (1 µg/µl). Finalmente, las secciones se lavaron en agua destilada, se dejaron secar al aire y se incubaron con xilol para su posterior montaje con DPX (Fluka Analytical, Germany). Las imágenes se capturaron digitalmente en un microscopio de fluorescencia (modelo DFC-480, Leica Microsystems), usando el filtro de FITC con luz de excitación azul (450-490nm). La cuantificación de las neuronas que presentan degeneración en la corteza cerebral se expresó en porcentaje de células inmunopositivas respecto al total de área analizada, Los porcentajes de cada grupo experimental se compararon con los de sus respectivos controles (no tratados). Aproximadamente, se analizaron 15 campos/área, de al menos 4-5 secciones cerebrales, y un mínimo de 3 animales/grupo

3.10.6. Inmunofluorescencia, simple y doble marcaje: NG2 y OLIG-caspasa-3.

3.10.6.1. Inmunofluorescencia de NG2.

Las secciones coronales de cerebro se incubaron en 0.3 % de peróxido de hidrógeno diluido en tampón PBS durante 5 min. con el objetivo de bloquear la actividad endógena de la enzima. Posteriormente, las secciones se lavaron y bloquearon siguiendo las instrucciones de la casa comercial para el ensayo de inmunodetección M.O.M., *mouse on mouse* (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Este ensayo permite la detección de proteínas en tejidos de ratón con anticuerpos monoclonales de ratón, evitando que se una inespecíficamente a las inmunoglobulinas de ratón endógenas presentes en el tejido. Las secciones cerebrales se incubaron durante toda la noche en una cámara de 4°C, con el anticuerpo primario monoclonal anti-NG2, proteoglicano condroitín sulfato (1/200, Millipore). Como anticuerpo secundario, se aplicó Rodamina (TRITC) (1/500, Jackson ImmunoResearch) durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras diferentes lavados, se tiñeron los núcleos con DAPI, diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (1 µg/mL, Sigma-Aldrich). Como control se utilizó el mismo ensayo pero omitiendo el anticuerpo primario. Las secciones se montaron con medio de montaje Dako (Dako, Alemania). Las imágenes se capturaron en un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim,

Germany) usando los objetivos de 20x y 40x en aceite Plan-HCX PL APO CS40x 1.25. Las ondas de excitación para los fluorocromos fueron 561 nm (DPSS) para el TRITC y 405 nm (diodo azul) para el DAPI. Todas las imágenes de confocal se tomaron en las mismas condiciones y la misma distribución de fluorescencia y se empleo el programa de confocal de Leica “Leica Lite”, versión 2.61. Los análisis cuantitativos se realizaron con el programa Image J versión 1.42q (USA). El número de células NG2 positivas se estableció mediante el conteo de células positivas en un área de 100 μm^2 al azar de cada capa cortical. Se utilizaron 3-4 cortes coronales diferentes de la corteza prefrontal (PFC) por animal, con un mínimo de 3 animales/grupo de estudio.

3.10.6.2. Doble Inmunofluorescencia de Caspasa-3 y Oligodendrocitos.

Para esta doble tinción, las secciones coronales de cerebro se bloquearon con un 5% de leche desnatada durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: ratón anti-oligodendrocitos (OLIG, 1/1000, Millipore) y conejo anti-caspasa-3 (CA3, 1/100, Cell Signalling). Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron anti-ratón (1/500) y anti-conejo (1/500), (Invitrogen, Molecular Probes) ambos conjugados con Alexa-Fluor. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma-Aldrich). Uno de los controles realizados fue la omisión del anticuerpo primario. Las secciones se montaron con medio de montaje Dako (Dako, Germany). Las imágenes se captaron con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2- AOBS (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) usando el objetivo de aceite de inmersión de 40x Plan-HCX PL APO CS40 x1.25. Las ondas de excitación que se utilizaron fueron: 488 nm (láser de Argon) para el verde Oregon, 633 nm (HeNe) para el Alexa Fluor 633 y Alexa Fluor 647, y finalmente, 405 nm (diodo azul) para el DAPI. Los estudios de colocalización se realizaron, tomando 2 imágenes de pseudocolor dimensionales (255 niveles de color) con un tamaño de 1024x1024 pixels. Todas las imágenes de confocal fueron adquiridas en las mismas condiciones y la misma distribución de la fluorescencia, y analizadas mediante el uso del programa de Leica “Leica Lite”, versión 2.61. El análisis cuantitativo se realizó

mediante conteo de 100-500 células de al menos 5 secciones coronales de corteza medial frontal por animal: 3 animales/ grupo de estudio. El grosor de cada sección coronal se determinó en cada sección. La densidad celular (mm^2) se calculó mediante la siguiente fórmula: $[\text{células contadas} / (\text{número de campos} \times \text{área total} (\text{mm}^2))]$.

3.11. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Los ratones se anestesiaron y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo usando una solución previamente preparada que contenía un 1% paraformaldehído, un 2.5% glutaraldehído todo ello disuelto en tampón cacodilato (0.1M, pH 7.4). Tras separar el cerebro y diseccionar la corteza cerebral y el cuerpo calloso, se cortaron pequeños bloques de estas zonas que se procesaron para microscopía electrónica, según se describe en estudios anteriores (Romero et al., 2010). Esta técnica fue realizada por el Dr. Jaime-Renau, Centro de Investigación “La Fe”. Las secciones se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión Philips CM100. Las características ultraestructurales de las fibras de mielina se evaluaron semicuantitativamente analizando aleatoriamente 100 axones mielinizados/grupo en un mínimo de tres áreas distintas (100 axones/área) y se estableció el porcentaje de axones mielinizados en cada grupo. Se analizaron tres ratones independientes por grupo. Los resultados han sido expresados como porcentaje de axones que presentan alteraciones en la mielina, respecto al grupo control.

3.12. MEDIDA DE APOPTOSIS: CASPASA-3 Y CASPASA-1.

Las caspasas son proteínas que pertenecen al grupo de las cisteín-proteasas, que se caracterizan por presentar un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas, siendo mediadores esenciales en los procesos de apoptosis. Dentro de este grupo, la caspasa-3 es la última responsable de la apoptosis celular y su actividad induce una degradación del ADN cromosómico en los núcleos de condensación de la cromatina.

3.12.1. Medida de Caspasa-3.

En el presente estudio, evaluamos los niveles de caspasa-3 tanto en lisados citoplásmicos de las cortezas cerebrales de los diferentes grupos de animales, como en tinciones inmunohistoquímicas. Para la medida de caspasa-3 en lisados se utilizó la técnica de inmunoelectrotransferencia para detectar procaspasa-3 (35 kDa) y la fracción activa de ésta a 17 kDa. La actividad de la caspasa-3 también se evaluó por el método de la inmunoperoxidasa indirecta, descrito anteriormente (ver Inmunohistoquímica).

La caspasa-1 es una enzima encargada de cortar las formas precursoras de la citoquinas inflamatorias IL-1 β e IL-18 principalmente, cuando se producen procesos inflamatorios (Franchi et al., 2012). Abordamos este estudio, desde dos puntos de vista: I) Inmunofluorescencia en tejido y II) determinación mediante kit enzimático para la detección de la actividad de Caspasa-1:

3.12.2. Inmunofluorescencia de caspasa-1.

Para este procedimiento, las secciones coronales del cerebro se incubaron con el kit FLICA caspasa-1 siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Immunochemistry Technologies, USA). Las imágenes se captaron con un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2- AOBS (Leica Microsystems, Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) usando los objetivos de 10X Plan-HCX PL APO CS10 y el de aceite de inmersión 40x Plan-HCX PL APO CS40x1,25. Las longitudes de onda de excitación usadas para los fluorocromo fueron: 488 nm (láser de Argón) y 405 nm (diodo Azul) para DAPI. Todas las imágenes de confocal se tomaron en las mismas condiciones y la misma distribución de la fluorescencia usando el programa de Leica Confocal “Leica Lite” versión 2.61. El análisis cuantitativo se realizó mediante el conteo de 5 áreas (500 μm^2) aleatoriamente para cada animal, 3 animales/grupo de estudio, usando el programa Image J 1.42 (NIH).

3.12.3. Medida de la actividad de caspasa-1.

La actividad de la Caspasa-1 (CASP-1) se midió usando un ensayo colorimétrico (CASP-1, Abcam). Este ensayo permite la detección del cromóforo *p*-nitroanilida (*p*NA) tras la ruptura del sustrato YVAD-*p*NA. La luz de emisión de

*p*NA se puede cuantificar usando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. La comparación de la absorbancia de *p*NA entre las muestras experimentales de los animales tratados crónicamente con etanol respecto a los controles, nos permite determinar los niveles de actividad de la CASP-1, siguiendo las instrucciones de la casa comercial.

3.13. DETERMINACIÓN DE CITOQUINAS.

Los niveles de citoquinas de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-18 e IL-33 (pg/ml) se determinaron mediante ELISA específicos (Bender-MedSystems para IL-1 β (BMS6002), TNF- α (BMS607/2), IL-18 (BMS618/2), y de eBioscience para IL-33 (# 88-7333-22) y para IFN- γ (#88-8314-22), o bien, se midieron los niveles de ARNm en el caso de IL-6. Los niveles de citoquinas se midieron en cerebro o en el medio de astrocitos. Para estas últimas determinaciones, las células se mantuvieron con medio definido y sin suero, y las citoquinas se determinaron en el medio a las 24 ó 48 h de cultivo. Para determinar niveles de citoquinas en corteza cerebral, 250 mg de las muestras de cerebro se homogeneizaron en 0,5 mL de tampón de lisis (1% NP-40, 20 mM Tris-HCl pH8, 130 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 μ g/ml aprotinina, 10 μ g/ml leupeptina, 10 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄ and 1 mM PMSF). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 30 min, se centrifugaron a 13000 rpm durante 15 min., y del sobrenadante se determinaron los niveles de citoquinas y los de proteína usando el método del Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.14. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

El aislamiento de ARN en las cortezas cerebrales, se realizó usando el procedimiento Tri-Reagent (Sigma), siguiendo las instrucciones de la casa comercial. La cantidad de ARN purificado se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm y 280nm, y la pureza se estableció analizando la relación de la absorbancia 260/280 nm. La integridad del ARN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para el análisis de RT-PCR, 1 μ g de ARN de cada muestra fue transcrita usando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche). El cDNA se diluyó (3 μ L) y amplificó en un termociclador (LightCycler Instrument; Roche Diagnostics)

en 10µL de LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche) y 0,5µM de cada oligonucleótido. La secuencia de cada uno de los cebadores o *primers* de los genes usados viene determinada en la Tabla 2.

Tabla 2: Secuencias *Forward* y *Reverse* de *primers* de los genes utilizados.

GENES	FORWARD	REVERSE
CASPASA-3	<i>TGGAGGCTGACTTCCTGTATG</i>	<i>AATTCGGTTGCCACCTTC</i>
NG-2	<i>AGCGTTCCCGAGGGCGGCACCCG</i>	<i>TCTGCAGGGCCCCGTGCTGCGGT</i>
CNPASE	<i>GCGGCCCGGAGACATAGTA</i>	<i>TGAGCCGAGCCAGTGTGGACT</i>
PLP	<i>CGGCAAGGGCCTGAGCGCAA</i>	<i>TGGCATCAGCGCAGAGACTGCCT</i>
MBP	<i>CAGAGCCGGAGCCCTCTGCCCTCT</i>	<i>CCCTCGGCCCCCTTCCCTTGGGA</i>
MOG	<i>GCCGGAGGACCTCAGCTTGGCCTG</i>	<i>ATGCGGCACGGCAGCTCTGCTT</i>
MAG	<i>GGCTGGGCCACGAGGGGCTGGGAG</i>	<i>GCAGCGGGCGGGGTTGCTGTC</i>
IL-6	<i>AAGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA</i>	<i>TCTTGGTCCTTAGCCACTCCT</i>
IL-1B	<i>TCATCTGGGATCCTCTCCAGTCAGG</i>	<i>AGCTCCACGGGCAAGACATAGG</i>
CASPASA-1	<i>CATCCTTCATCCTCAGAAACA</i>	<i>CCTCCAGCAGCAACTTCATT</i>
IL-1B (II)	<i>CTCATTGTGGCTGTGGAGAA</i>	<i>TCTAATGGGAACGTCACACA</i>
IL-18	<i>TGGCCCAGGAACAATGGCTGCCA</i>	<i>GCGGTTGTACAGTGAAGTCGGCCAA</i>
CD68	<i>ACGACCAGCCACAGGCCACCAC</i>	<i>CTGGGAGCCGTTGGCCACGTGT</i>
MPO	<i>AGTGGGTGAGCTCGGCACGG</i>	<i>TTCGACACGGTGGTGATGCCAG</i>
MCP-1	<i>TGCTGTTACAGTTGCCGGCT</i>	<i>GGGGTCAGCACAGACCTCTCTCTT</i>
MHCII	<i>GAAGACGACATTGAGGCCGACC</i>	<i>GGAATTGGGGAACACAGTCGC</i>

SP1	<i>ACAAGCCCAGACAATCACC</i>	<i>TGTATCCCATCACCACCAG</i>
CYCA	<i>GTCTCCTTCGAGCTGTTGC</i>	<i>GATGCCAGGACCTGTATGCT</i>

Los niveles ARNm de los genes SP1 o CypA se utilizó como control interno de normalización de los datos. Para asegurarnos de que los tratamientos no alteraban los niveles de ARNm del control interno, los valores de Ct se compararon entre los grupos. No se encontraron diferencias en los niveles de ARNm de SP1 o CypA. Para la cuantificación de los productos de la PCR, se analizó la fase exponencial de la amplificación de la curva de meelting y se cuantificó mediante el programa de *LightCycler 480 quantification*, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.15. SISTEMA DE IMAGEN IN VIVO.

Las imágenes se tomaron con el sistema de imagen IVIS-200 (Caliper Life Sciences, Germany). Usamos un fluoróforo conocido como es XenoLight CF770 para preparar la unión y marcaje fluorescente de nuestras proteínas de estudio; proteína proteolípido (PLP), cuyo marcaje es de mielina, proteína ácida fibrilar (GFAP) que marca astrocitos, MAP-2, cuyo marcaje es de neuronas. Todas las sondas fluorescentes se administraron entre 24-72 horas antes de la sesión de imagen. Todas las sondas presentaron la máxima eficiencia a las 24 horas post-inyección. Además, también usamos una sonda ya preparada por la casa comercial (Caliper Life Sciences) denominada Inflamación *Rediject*, que detecta inflamación en el animal vivo. Los valores se expresaron en % de la eficiencia radiante.

3.16. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Para la cuantificación del trabajo experimental se utilizó el programa SPSS versión 17.0, y los resultados obtenidos se expresaron como la media \pm SEM. Las diferencias significativas de los resultados se analizaron mediante el uso de la prueba no paramétrica de la U Mann-Whitney, comprobando la normalidad por el test de la Z Kolmogorov-Smirnov, o bien, mediante la Prueba t-student. Para los análisis de la PCR a tiempo real (RT-PCR) se usó el ANOVA de una vía,

expresando la significación del valor F seguido de un análisis *post hoc* (Student–Newman–Keuls. Consideramos significativo p-valor <0.05.

El programa GraphPad (versión 3) se utilizó para la construcción de las gráficas y el Adobe Photoshop (versión 7.0) para el procesamiento de las imágenes y figuras.

4. RESULTADOS

4.1 EL ETANOL CAUSA NEUROINFLAMACIÓN Y DAÑO CEREBRAL: PAPEL DEL RECEPTOR TLR4.

4.1.1. El silenciamiento de la función del receptor TLR4 evita la activación de la cascada inflamatoria inducida por etanol en astrogliá.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado que concentraciones bajas o moderadas de etanol (10mM o 50mM) eran capaces de activar la cascada de señalización de TLR4 en astrocitos, induciendo una rápida fosforilación de varias quinasas (IRAK, MAPKs), la activación del factor de transcripción kappa B, conocido como NF- κ B y la posterior inducción de mediadores inflamatorios tras 30 minutos de estimulación con etanol (Blanco et al., 2005).

Con el objeto de evaluar el papel de los receptores TLR4, en la cascada de señalización inflamatoria inducida por el etanol en astrocitos, decidimos silenciar la expresión de este receptor, mediante el uso de ARN de interferencia (*siRNA*), y posteriormente analizamos la respuesta inflamatoria inducida por el etanol en astrocitos. Se utilizaron 2 tipos de siRNA, uno que silenciaba los exones 1,2 y el segundo que silenciaba el exón 3, del gen que codifica al receptor TLR4 de rata. Se utilizó paralelamente un control negativo de siRNA (NegCsiRNA).

Debido a la dificultad de transfectar cultivos primarios de astrocitos, y después de haber utilizado distintos procedimientos de transfección, decidimos usar el método de nucleofección en condiciones específicas (ver Material y Métodos) para transfectar astrocitos. Específicamente, utilizamos un kit de la casa comercial Amaxa. Mediante este procedimiento, y utilizando un vector fluorescente, pmaxGFP, comprobamos que un 76 % de las células se transfectaban (Fig. 1B). Además, en nuestras condiciones experimentales, la máxima eficiencia de silenciamiento para el receptor TLR4 fue a las 48h post-nucleofección. De modo que, tras 48 h de transfección, las células se estimularon con LPS (50ng/mL) o con etanol (10 y 50 mM) durante 30 minutos, y se evaluaron los niveles de TLR4 (Fig. 1A).

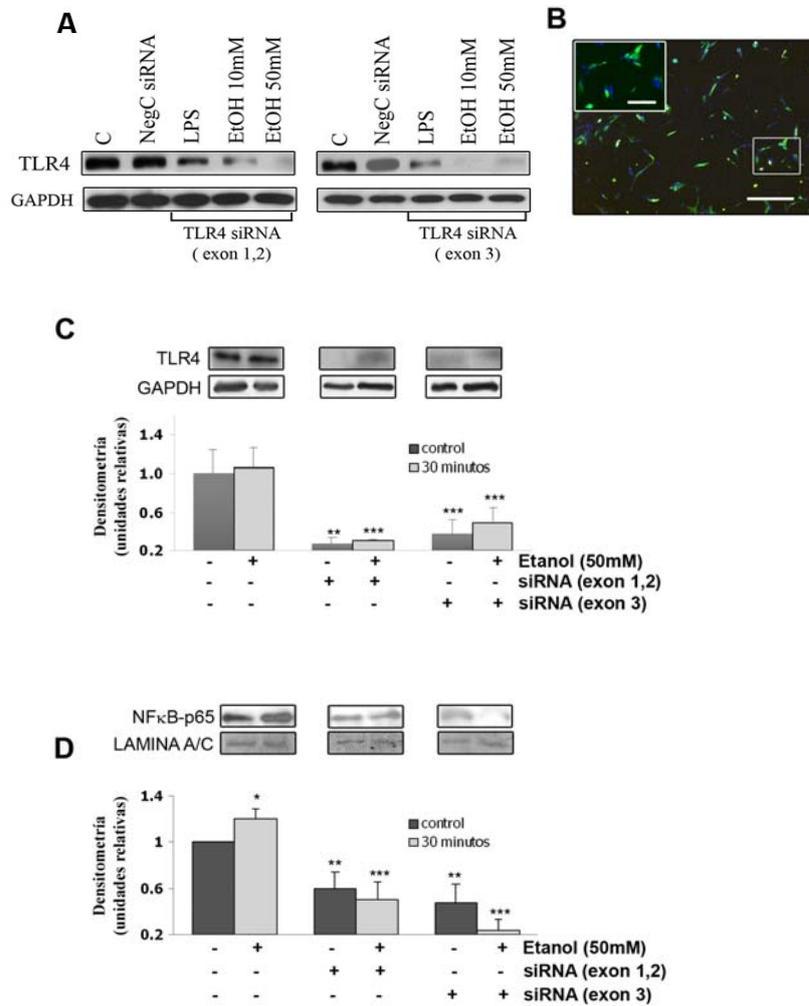


Figura 1: Efecto del silenciamiento del receptor TLR4 en astrocitos tras su estimulación con etanol durante 30 minutos. A: La transfección de siRNA que silencia los exones 1,2 o el exón 3 del gen TLR4, causa una importante reducción en los niveles del receptor TLR4 en astrocitos, tras 48 h de la transfección y su posterior estimulación con LPS (50 ng/ml) o etanol. Como control negativo y especificidad del silenciamiento se utilizó siRNA (NegCsiRNA). B: Mediante el uso del vector fluorescente pmaxGFP (microfotografía, escala=100µm, con detalle a escala= 20µm y un aumento óptico de 1.6X) comprobamos el grado de eficiencia de transfección que fue del 76%. C, D: Astrocitos, 48 horas post-transfección con siRNAs de TLR4 y estimulados con etanol durante 30 min. Niveles del receptor TLR4 en extractos celulares (C) o NF-κB/p65 en extractos nucleares (D). Los datos expresan la [media ± S.E.M.], obtenida de 3-4 cultivos diferentes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (prueba t-Student).

Según muestra la Fig.1 A y C, la transfección con siRNA TLR4 disminuyó significativamente los niveles del TLR4 tanto en astrocitos estimulados con LPS (50 ng/ml) o con etanol, a concentraciones bajas o moderadas (10 o 50 mM respectivamente). Además, la activación de NF- κ B, exactamente de la subunidad p65 de NF- κ B (NF- κ B/p65) inducida por el etanol, disminuyó de forma significativa en los extractos nucleares de células transfectadas con los distintos siRNA del TLR4, sugiriendo que el receptor TLR4 contribuye a la activación del factor NF- κ B inducida por etanol (Fig.1C).

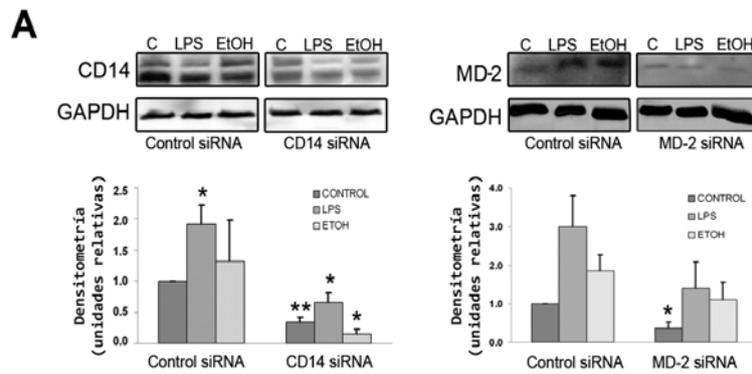
4.1.2. CD14 y MD-2 participan en la activación de la respuesta innata inmune mediada por los receptores TLR4 e inducida por etanol en astroglía.

La activación de la respuesta inmune innata mediada por los receptores TLR4 y por su ligando LPS, requiere la participación de DM-2 (*MD-2*) y CD14. El MD-2 (*myeloid differentiation-2*), conocido como factor de diferenciación mieloide-2, es una proteína físicamente asociada al TLR4, y parece tener un papel esencial en el reconocimiento del LPS con el TLR4 (Nagai et al., 2002), mientras que el CD14 es un glicoproteína rica en glicosilfosfatidilinositol que se une al LPS e incrementa la respuesta del TLR4 (Perera et al., 2001).

Por tanto, para analizar si el CD14 y el MD-2 contribuían a la activación del TLR4 inducida por etanol, utilizamos dos aproximaciones experimentales: (1) pequeños ARN de interferencia, *siRNA*, con dianas a MD-2 y CD14, y (2) anticuerpos bloqueantes para ambas proteínas. Para abordar la primera aproximación, y después de la validación de los *siRNA*, se obtuvo que la máxima eficiencia de silenciamiento para los genes CD14 y para MD-2 fue tras 96 h. de transfectar las células. Por tanto, a las 96 horas post-trasfección con los siRNAs específicos para silenciar el CD14 y el MD-2, los astrocitos se trataron con etanol (50mM) y con LPS (50ng/mL) durante 10 y 30 minutos. Se determinaron los niveles de fosfo-ERK (p-ERK) y de la subunidad NF- κ B/p65 en los extractos celulares y nucleares, respectivamente. Como se muestra en la Figura 2B, las células estimuladas con LPS o con etanol tras el silenciamiento del factor MD-2 o bien de la proteína CD14, disminuyen significativamente la activación de la proteína ERK y de

la subunidad NF-kB/p65, tomando como control las células no trasfectadas (Fig. 2A, B).

Para la segunda aproximación experimental, usamos un anticuerpo monoclonal descrito como bloqueante de CD14 (Gong et al., 2002). Para estos experimentos, los astrocitos se incubaron con anti-CD14, 1 h. antes y durante las 3 h. de tratamiento con LPS (50ng/mL) o etanol (50mM). Al final del tratamiento, se determinaron los niveles de ARNm de IL-1 β en los extractos celulares. Como muestra la Figura 2C, el tratamiento con LPS o con etanol, estimula los niveles de ARNm de IL-1 β en los astrocitos, y el uso del anticuerpo bloqueante de CD14, reduce de forma significativa la expresión del IL-1 β mediada por LPS o por etanol, aunque en el caso del etanol las diferencias mostraban una tendencia, pero no fueron significativas.



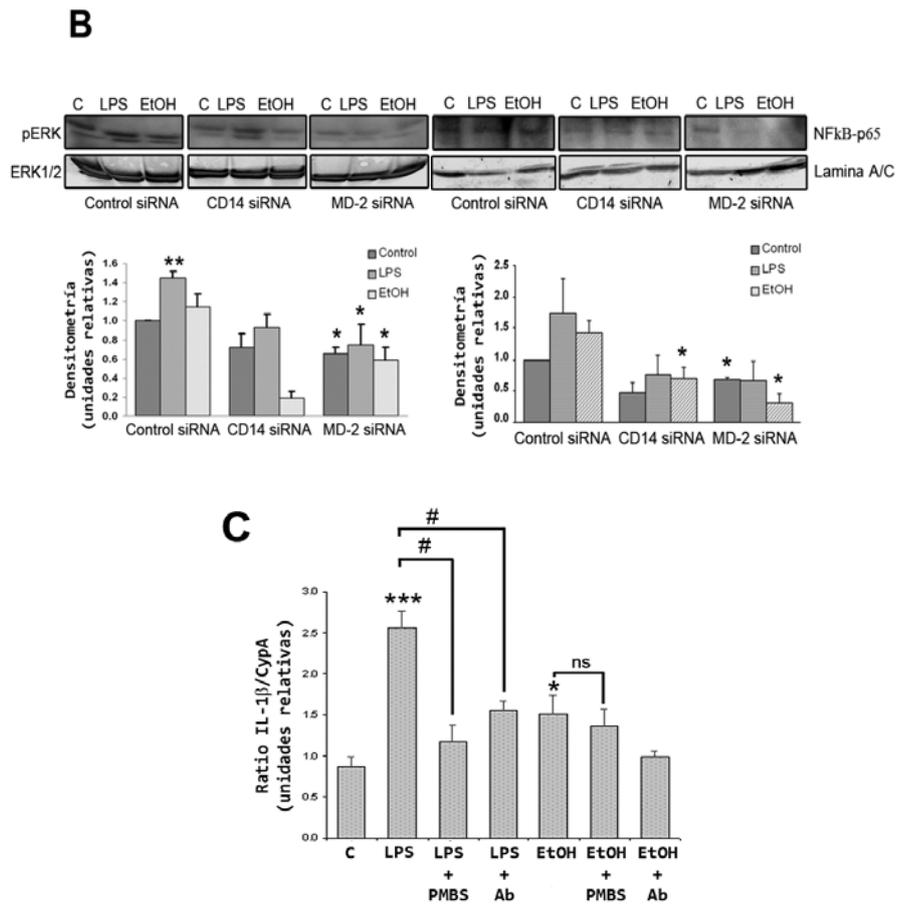


Figura 2: CD14 y MD-2 participan en la respuesta de TLR4 inducida por etanol. A: Los astrocytes de rata fueron transfectados usando siRNA con diana a CD14 o MD-2 o con un control negativo (ON-TARGETplus SMART pool siRNA). B: Tras 96 h. post-transfección, las células se estimularon con LPS (50 ng/ml) o etanol (50mM) durante 10 y 30 min., evaluando los niveles de pERK y NF-κB/p65, en extracto celular y nuclear, respectivamente. C: Los astrocytes se preincubaron con anti-CD14 durante 1h., y tras esto, fueron tratados con LPS (50 ng/ml) o etanol (50 mM) durante 3 horas. En algunos casos, las células se trataron con LPS o etanol durante 3h. en presencia o ausencia de PMBS (10μg/ml). Se determinaron los niveles del ARNm de IL-1β. Las barras representan la media de 3 experimentos independientes, y se expresan como [media ± S.E.M]. *.# p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (prueba t-Student). C, Control; ns, no significativo.

En los experimentos que se muestran en la Figura 2C, quisimos comprobar que los efectos que estábamos observando con el etanol no eran debidos a una posible contaminación del etanol con LPS. Para ello, utilizamos sulfato de polimixina B, PMBS (10μg/mL), un *scavenger* o captador de LPS. Este compuesto

se añadió al medio de cultivo 15 minutos antes y permaneció durante los tratamientos con LPS o etanol. Los resultados de la figura 2C, muestran que mientras la presencia de PMBS impide el incremento de la expresión de IL-1 β inducido por LPS, este compuesto no modifica de forma significativa los niveles de ARNm de IL-1 β inducidos por el etanol, excluyendo la posibilidad de que los efectos observados con el etanol fueran debidos a una contaminación por LPS.

4.1.3. El tratamiento de etanol no activa la respuesta inflamatoria en astrocitos de ratones TLR4 knockout.

Para profundizar en el papel de los receptores TLR4, respecto a la activación de la respuesta inflamatoria en astrocitos tratados con etanol, aislamos astrocitos corticales de ratones TLR4^{+/+} y deficientes para este receptor, TLR4-KO. Las células se trataron con etanol 10 mM, concentración mínima de etanol que es capaz de estimular la respuesta innata inmune y la cascada de señalización del TLR4 (Blanco et al., 2005; Blanco et al., 2008).

La estimulación de astrocitos de ratones WT con etanol o con LPS, causó una rápida inducción, a los 10 minutos, de la proteína adaptadora MyD88 y de la fosforilación de ERK (p-ERK), así como un posterior aumento de la fosforilación de I κ B- α y la translocación al núcleo de NF- κ B, tras 30 minutos de tratamiento (Fig.3). Los cambios rápidos en MyD88 y p-ERK que se observan a los 10 min. de la estimulación con etanol o con LPS, indican que ambos compuestos son capaces de activar la cascada de señalización del TLR4 en astrocitos.

En la figura 3, también se demuestra que tanto el etanol como el LPS inducen la activación de los mediadores inflamatorios, iNOS y COX-2, tras los 30 minutos de tratamiento en astrocitos de animales TLR4^{+/+}. Sin embargo, el tratamiento con LPS o con etanol, no produjo en ningún caso, la activación de MyD88/ NF- κ B o la sobreexpresión de los mediadores inflamatorios (iNOS y COX-2) en astrocitos de ratones deficientes para el receptor TLR4 (Fig. 3). Estos resultados, indican el papel fundamental del TLR4 en la cascada de señalización asociada a la producción de mediadores inflamatorios, inducida por el etanol en astrocitos.

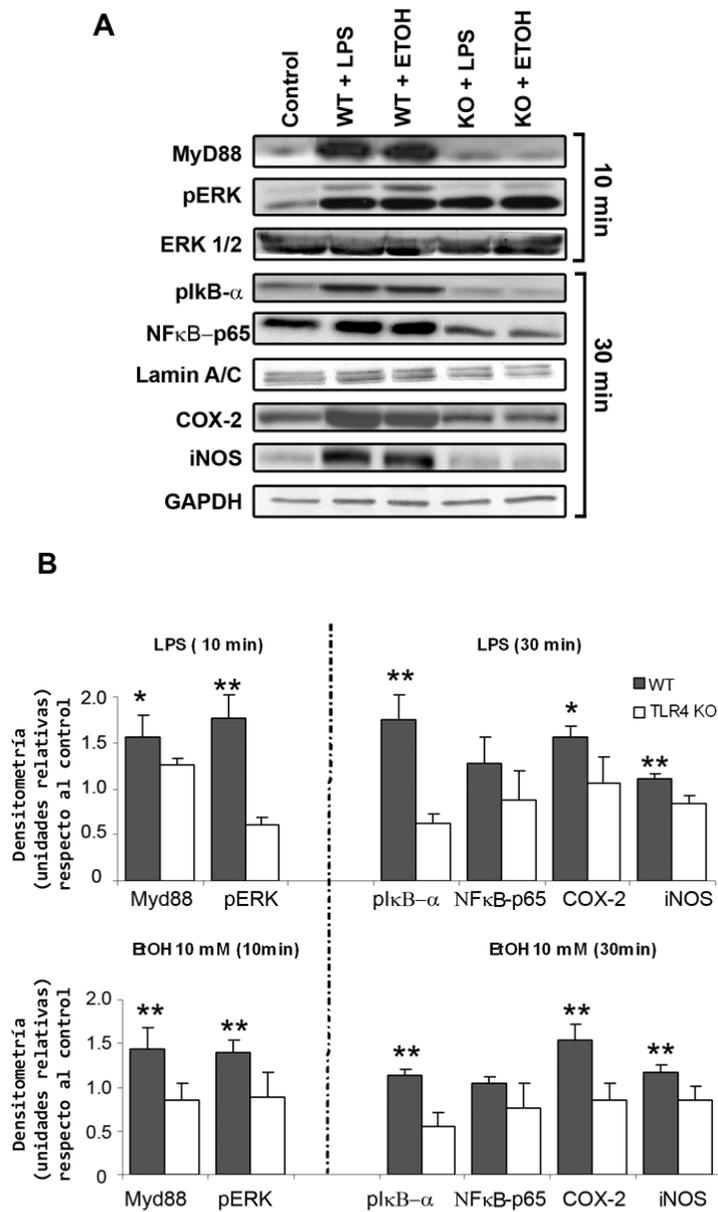


Figura 3: Implicación de TLR4 en la cascada de señalización inflamatoria inducida por el etanol en astrocitos. A: Western blot de proteínas principales implicadas en la cascada de señalización, en donde observamos un marcado aumento de MyD88, p-ERK, p-IκB-α y NF-κB/p65 en células control tratadas tanto con etanol (10mM) o con LPS(50ng/mL), mientras los astrocitos procedentes de ratones TLR4-KO no presentan variaciones entre tratamientos. B: Cuantificación de los resultados obtenidos por densitometría de las bandas obtenidas por Western blot. Los resultados son la media de un mínimo de 6 experimentos diferentes expresados como [media ± S.E.M.], * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Prueba t-student).

4.1.4. Papel de los receptores TLR4 en la activación glial, neuroinflamación y neurodegeneración inducida por el etanol en cerebro.

La activación glial, se considera un marcador de neuroinflamación y se asocia normalmente con patologías de origen neurodegenerativo (Heneka et al., 2005). Por tanto, evaluamos la posible activación de la glía en cerebros de animales con un consumo crónico de alcohol.

4.1.4.1. Las células gliales se activan en cerebros de animales con un tratamiento crónico de etanol.

Para analizar el papel *in vivo* de los receptores TLR4 en la activación glial inducida por el etanol y la neuroinflamación, se evaluó mediante técnicas inmunohistoquímicas, la posible estimulación de las células gliales (astroglía y microglía), en cortezas cerebrales de ratones TLR4^{+/+}, cepa C57BL/6 y mutantes TLR4-KO, tras un consumo crónico de alcohol durante 5 meses (ver Material y Métodos).

Para determinar la reactividad astrocítica, usamos la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), proteína que forma los filamentos intermedios del citoesqueleto de astrocitos. Además, activaciones o incrementos en la inmunoreactividad de la GFAP, son considerados como marcadores de neurotoxicidad tras un daño neural (Otani et al., 2006), además de contribuir en la neurodegeneración (Maragakis and Rothstein, 2006).

Los resultados de la figura 4, muestran que mientras en la corteza cerebral de los ratones WT no tratados, la tinción de GFAP se presenta tenue y distribuída de forma homogénea, en los ratones WT tratados crónicamente con etanol se observa un notable incremento en la inmunoreactividad de la GFAP para determinadas capas profundas (IV-VI) de la corteza cerebral (Fig.4Aa). Incluso, observamos procesos de gliosis reactiva, mostrando una evidente hipertrofia celular en algunas zonas (Fig.4Ab. ver ampliación).

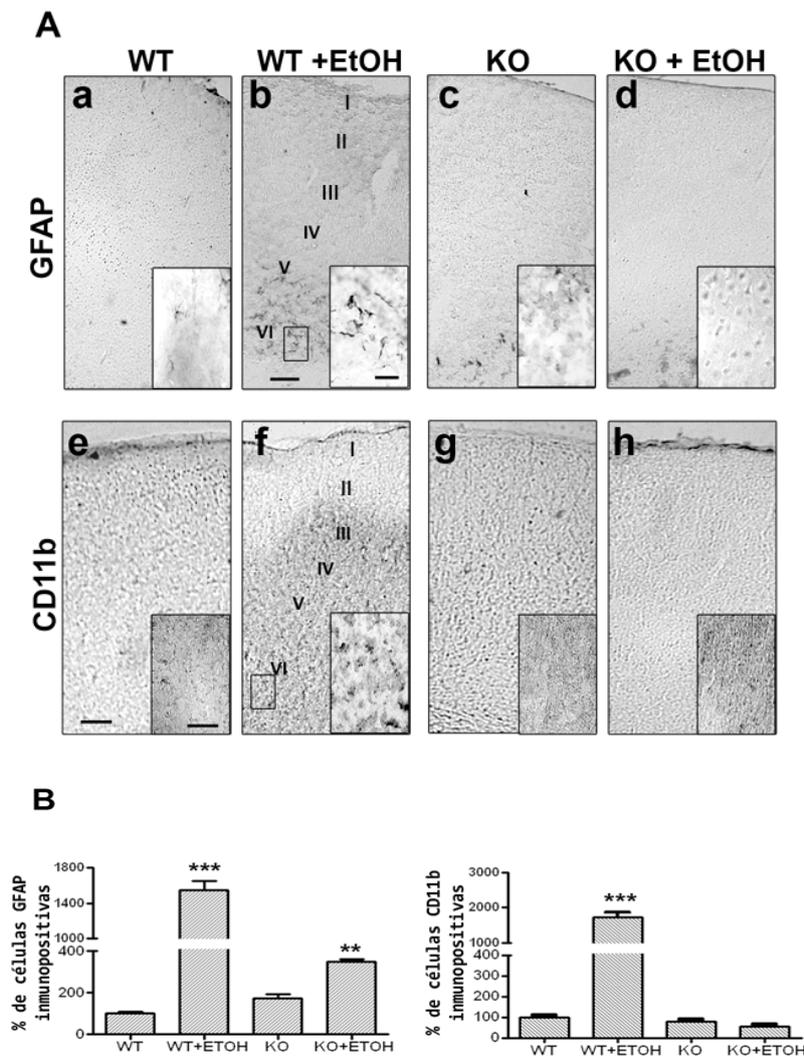


Figura 4: Activación de GFAP y CD11b en corteza de ratones control (WT) y TLR4 knockout (KO) con consumo crónico de etanol. A: el consumo crónico de etanol está correlacionado directamente con un aumento del marcaje GFAP (b) y de CD11b (f) en la corteza cerebral de ratones WT, cuando comparamos con sus controles (a, e; escala; 200µm). Asimismo observamos una marcada hipertrofia astrocítica en el caso de ratones WT tratados (ver ampliación) en las zonas lesionadas (capas IV-VI), detalle de gliosis reactiva (b) (escala; 20 µm). B: La cuantificación de la inmunohistoquímica muestra un incremento significativo de GFAP y CD11b en ratones WT tratados con etanol respecto al control no tratados. Los ratones KO tratados (d), también presentan un aumento moderado de GFAP respecto a su control (c). Sin embargo, para CD11b, no existen diferencias significativas si comparas entre ratones KO tratados (h) y sus controles (g). (DAB-níquel, escala; 200µm, con detalles a 50µm, magnificación óptica 1.6X). Se representa un total de 3 experimentos independientes, y se expresan como [media±S.D.] ** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov).

La cuantificación de células positivas para GFAP que se muestra en la figura 4B, demuestra que la inmunoreactividad para GFAP se incrementa muy significativamente (~16 veces) en la corteza medial frontal de los ratones WT tratados con etanol cuando se compara con los no tratados o grupo control. Sin embargo, en la corteza cerebral de animales deficientes para TLR4 o TLR4-KO (Fig. 4Ad) y tratados con etanol (Fig. 4Ac) sólo detectamos un ligero incremento, aunque significativo (~3 veces), en la inmunoreactividad del GFAP cuando se comparan con sus controles no tratados con etanol.

Del mismo modo, el consumo crónico de etanol activa significativamente la actividad de las células microgliales, como muestra el notable incremento en la inmunoreactividad del CD11b, marcador de activación microglial, en la corteza cerebral de ratones WT tratados con etanol (Fig. 4Af), cuando se compara con los controles no tratados (Fig. 4Ae). Sin embargo, los niveles de intensidad de marcaje para CD11b fueron similares entre TLR4-KO tanto tratados (Fig. 4Ah) como no tratados (Fig. 4Ag) con etanol. Estos resultados demuestran el papel relevante de TLR4 en la activación glial inducida por un consumo crónico de etanol.

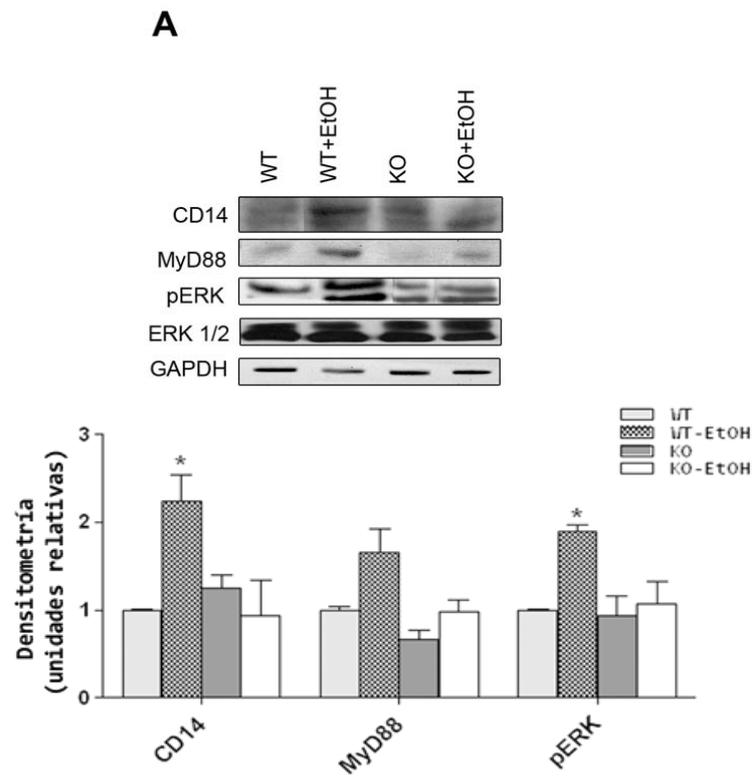
4.1.4.2. El etanol activa la señalización del TLR4 en corteza cerebral de animales con un consumo crónico.

Para determinar si la activación de las células gliales se asociaba con la estimulación de la cascada de señalización de TLR4, determinamos los niveles de las proteínas que participan en dicha señalización como el CD14, MyD88, p-ERK y la subunidad p65 de NF- κ B (NF- κ B/p65) en cortezas cerebrales de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO tratados y no tratados crónicamente con etanol durante 5 meses.

Los resultados en la Figura 5 muestran que el tratamiento crónico de etanol en ratones WT o TLR4^{+/+} incrementa los niveles de MyD88 y p-ERK (Fig. 5A) y la activación de la subunidad NF- κ B/p65, que se asocia a una disminución significativa de la fosforilación de I κ B- α (Fig. 5B). Sin embargo, este tratamiento crónico, no provocó cambios importantes en los niveles y/o activación de las proteínas descritas en los ratones TLR4-KO.

Además, el tratamiento crónico de etanol aumentó significativamente los niveles de CD14 en los ratones silvestres, pero no en los TLR4-KO (Fig. 5A). Estos

resultados, confirman el papel del complejo CD14/TLR4 en la iniciación de la cascada de señalización neuroinflamatoria, activada en respuesta al etanol.



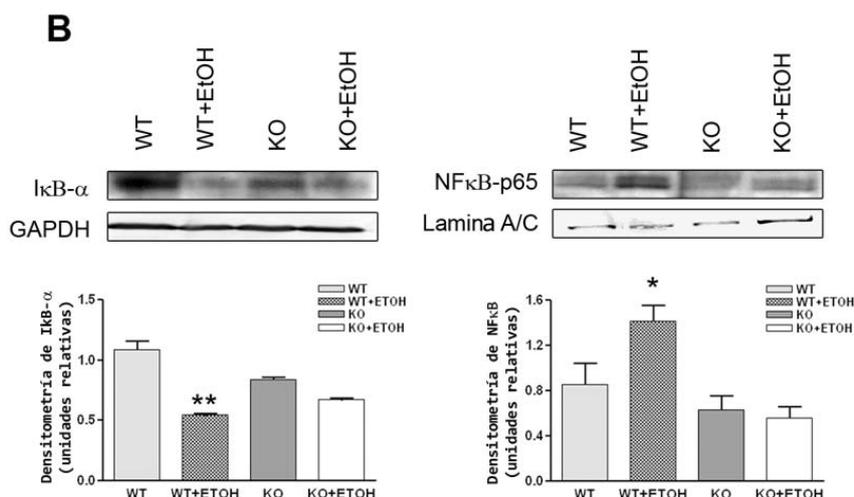


Figura 5: El tratamiento crónico de etanol incrementa los niveles de MyD88, p-ERK, CD14 y NF-κB/p65. A: Western blots representativos de MyD88, p-ERK y CD14 en homogenados de corteza cerebral y su cuantificación por análisis densitométrico de las bandas en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO. B: Western Blots representativos de NF-κB/p65 e IκB-α de extractos nucleares y citoplasmáticos, respectivamente. GAPDH y la Lamina A/C se utilizaron como controles de carga. Las barras muestran la densitometría de al menos 3-4 experimentos independientes, y representan la [media ± S.E.M.]. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student).

4.1.4.3. El consumo crónico de alcohol induce citoquinas y mediadores inflamatorios en cerebro.

La activación de la cascada de señalización de TLR4/NF-κB (Takeda and Akira, 2004) puede desencadenar la inducción transcripcional de genes que codifican citoquinas y otros mediadores inflamatorios (ej. iNOS y COX-2) (Perkins, 2000). Por tanto, nuestro próximo objetivo fue el evaluar los niveles de citoquinas en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO tratados y no tratados con etanol. En la Figura 6, podemos observar que el tratamiento crónico de alcohol, induce una sobreexpresión en los niveles de TNF-α, IL-1β y ARNm de IL-6 en la corteza cerebral de ratones WT, mientras que no se observaron cambios significativos en los niveles de esas citoquinas en la corteza cerebral de los ratones TLR4-KO.

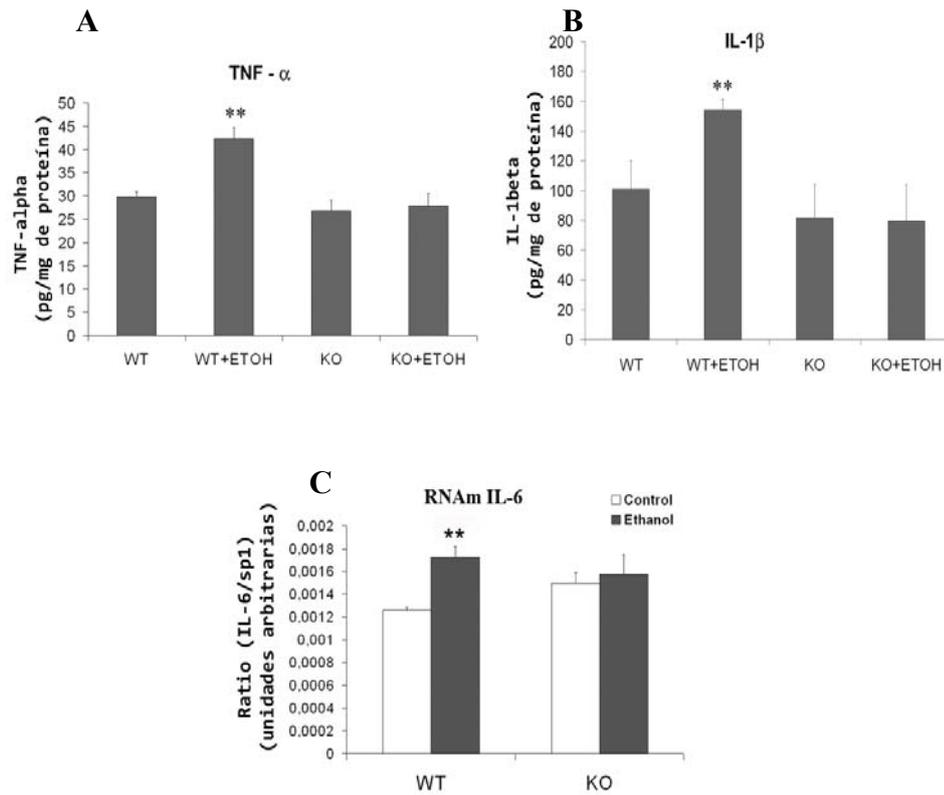
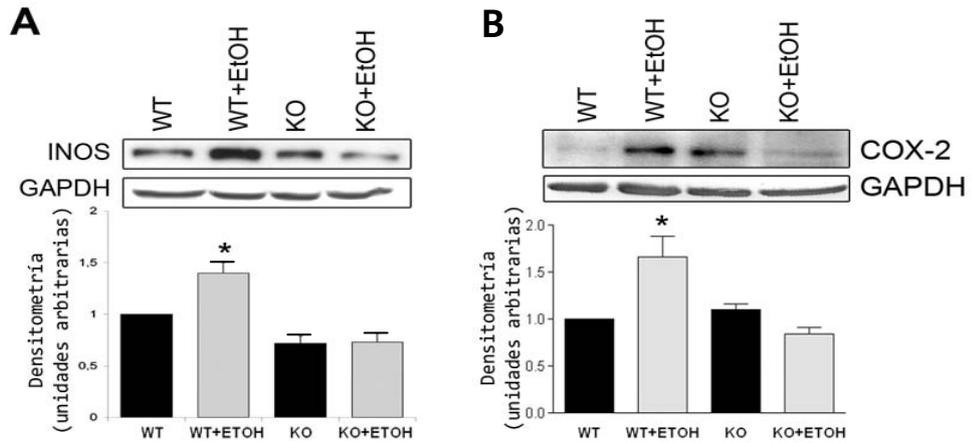


Figura 6: El consumo de alcohol incrementa los niveles de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en homogenados de corteza cerebral. El análisis de TNF- α (A) e IL-1 β (B) se realizó por ELISA, mientras que los niveles de ARNm para la citoquina IL-6 se evaluaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). Las barras representan la [media \pm SEM] de 5-6 experimentos independientes. ** $P < 0.01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student).

Tras comprobar que el consumo de alcohol inducía un aumento de los niveles de citoquinas, decidimos evaluar si este tratamiento también incrementaba los niveles de iNOS y COX-2. Los resultados de la figura 7 (A, B) demuestran que los niveles de ambas proteínas, evaluados mediante inmunoelectrotransferencia, aumentan en corteza cerebral de animales WT tratados con etanol, cuando se comparan con los niveles de los animales no tratados. Sin embargo, los niveles de iNOS y COX-2 fueron similares en la corteza cerebral de ratones TLR4-KO tratados o no con etanol (Fig.7 A, B).

Para confirmar los resultados anteriores, realizamos mediante la técnica de inmunohistoquímica el marcaje de iNOS y COX-2 en corteza cerebral. La Figura 7 muestra que la inmunoreactividad tanto de iNOS (Fig. 7C) como de COX-2 (Fig.7D) es significativamente mayor en el caso de los ratones WT tratados crónicamente con alcohol respecto a sus controles. Asimismo, no hubo diferencias significativas en el caso de los ratones TLR4-KO (Fig. 7C, D).

Para obtener más información sobre la localización celular de la sobreexpresión del mediador inflamatorio COX-2, realizamos un estudio de colocalización de COX-2 con astrocitos (GFAP) (Fig. 8A) o con microglía (iba-1) (Fig. 8B) o con neuronas (NeuN) (Fig. 8C). Los resultados de la Figura 8, muestran que mientras en la corteza cerebral de ratones control no tratados, la expresión de la COX-2 es muy baja en neuronas [NeuN+, 13.5±3%], astrocitos [GFAP+ 24±5.4%] o microglía [Iba-1+, 25±2.4%], el porcentaje de células COX-2 que colocaliza con astrocitos, microglía y neuronas fue mucho mayor en los ratones WT tratados con etanol [GFAP+, 84 ± 15%; Iba-1+, 73 ±0.9%; NeuN+, 51±11%].



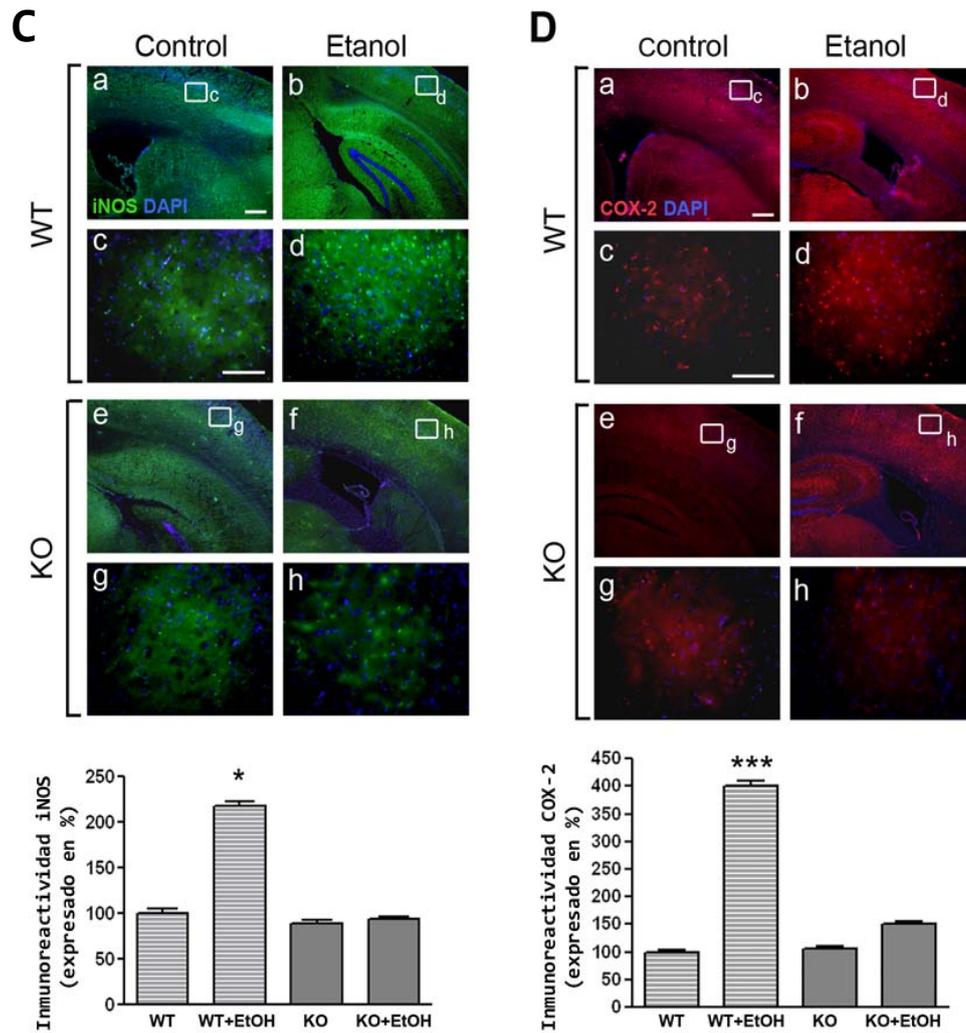
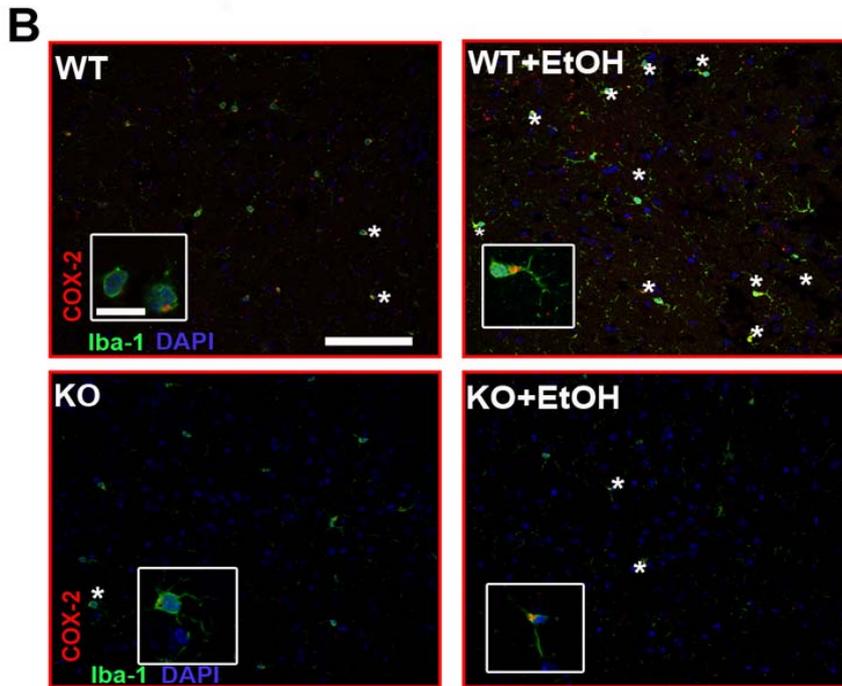
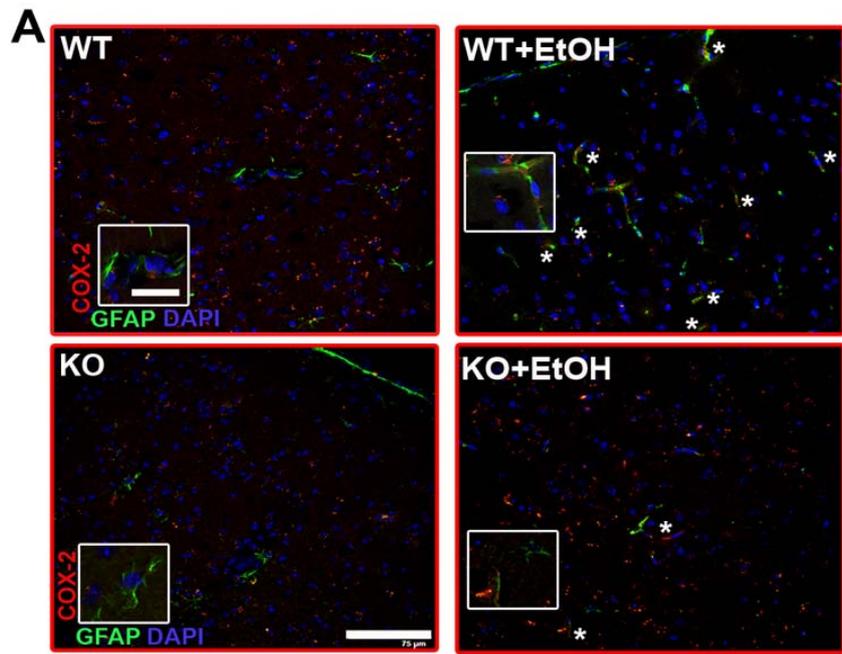


Figura 7: Papel de los receptores TLR4 en el aumento en los niveles de iNOS y COX-2 en corteza cerebral de animales con consumo crónico de etanol. A, B: Niveles de proteínas de iNOS (A) y COX-2 (B) analizados por inmunoelectrotransferencia en corteza cerebral de ratones WT y TLR4-KO tratados/no tratados con alcohol. Las barras representan la [media±S.E.M.] de 4-6 experimentos independientes. * $P < 0.05$ (Prueba t-student). C;D: Inmunohistoquímica de iNOS (C) y COX-2 (D) en la corteza medial frontal (escala: a, b, e, f, 200µm; c, d, g, h, 50µm). Las barras representan la [media±S.D.] de la cuantificación de la tinción específica de iNOS y COX-2, expresada en porcentaje. Analizamos de 5-8 campos distintos por muestra en al menos 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$ ** $P < 0.005$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student).



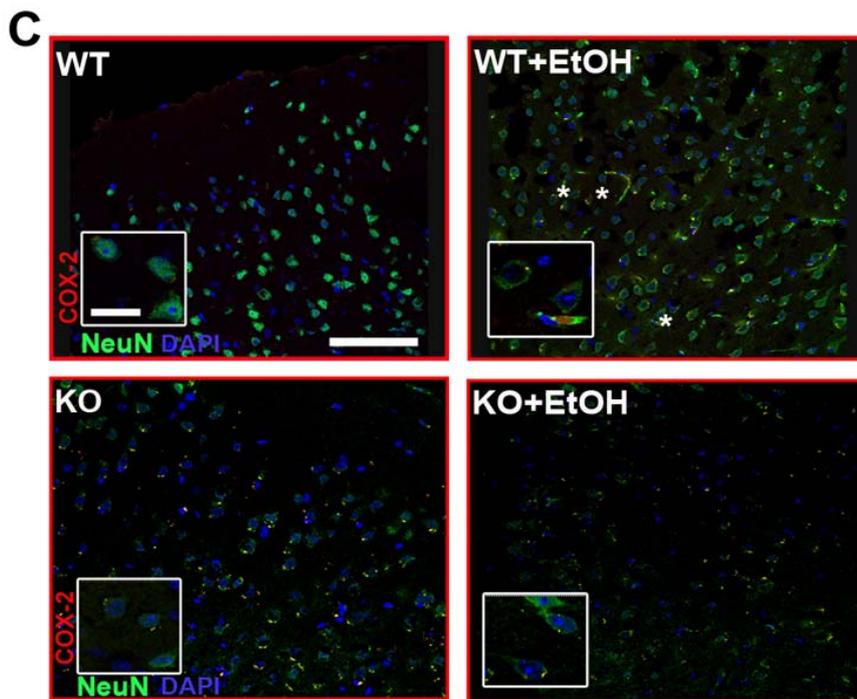


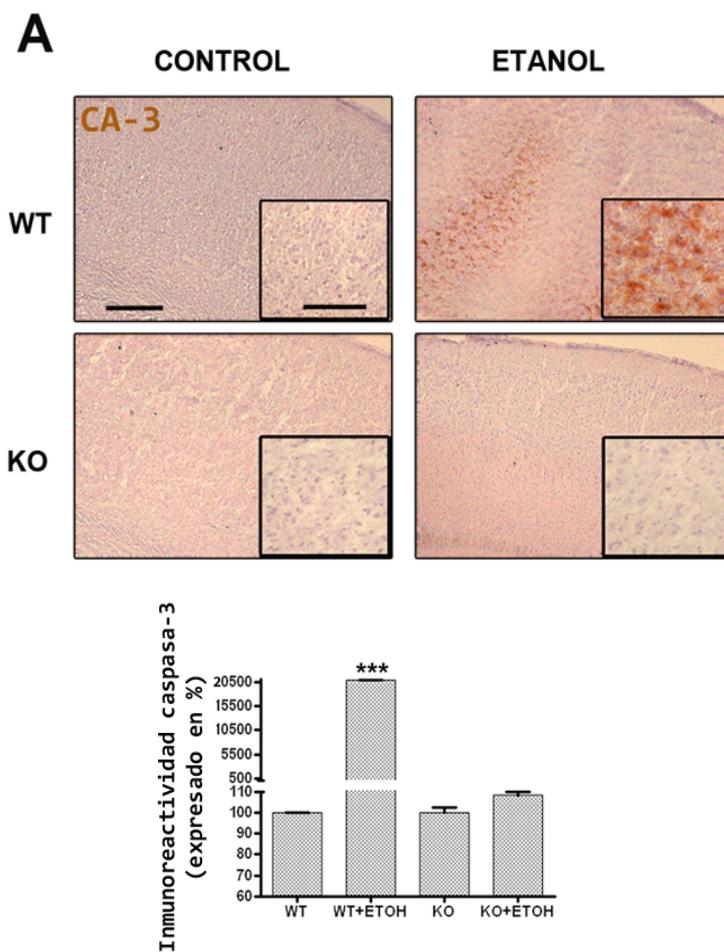
Figura 8. Colocalización de COX-2 con distintos tipos celulares en corteza cerebral de animales $TLR4^{+/+}$ (WT) y $TLR4-KO$. Las imágenes de confocal se tomaron en un microscopio Leica TCS-SP2-AOBS y muestran la localización de COX-2 (rojo) en astrocitos $GFAP^+$ (A) o microglía $iba-1^+$ (B) o neuronas $NeuN^+$ (C) en corteza de ratones WT y $TLR4-KO$ tratados/no tratados con etanol durante 5 meses. Una elevada proporción de COX-2 colocaliza con astrocitos, microglía y neuronas en el caso de las cortezas de ratones WT con tratamiento crónico de etanol [escala; 75 μ m, detalle a 15 μ m].

Al mismo tiempo, estos estudios también nos indicaron que la expresión de COX-2 en neuronas y microglía era prácticamente similar para los ratones $TLR4-KO$ tratados o no tratados con etanol crónicamente [$TLR4-KO$ Iba-1+, 28 \pm 3.4%; $TLR4-KO$ plus EtOH, 27 \pm 1.5%]. Sin embargo, observamos un ligero incremento significativo de expresión de COX-2 en astrocitos de ratones $TLR4-KO$ tratados con etanol durante 5 meses [GFAP+, [45 \pm 2.9%] respecto a sus controles [23.2 \pm 4.5%].

Estos resultados, corroboran el papel esencial de los receptores TLR4 en la activación glial y neuroinflamación inducida por un abuso de alcohol.

4.1.4.4. El tratamiento crónico de alcohol activa la caspasa-3 e induce degeneración neuronal.

Nuestro próximo objetivo, fue analizar si los cambios neuroinflamatorios que habíamos observado se asociaban con una muerte neural. De este modo, decidimos determinar los niveles de caspasa-3 (CA-3), y así establecer el posible papel de los receptores TLR4 en la apoptosis producida por un tratamiento crónico de alcohol. Analizamos los niveles de activación de la CA-3, la cuál participa en las últimas fases de la apoptosis celular, en la corteza cerebral de los ratones WT y TLR4-KO tratados crónicamente con etanol. Los niveles de CA-3 se evaluaron mediante técnicas de inmunohistoquímica (Fig. 9A), inmunoelectrotransferencia (Fig. 9B) y PCR a tiempo real (Fig. 9C).



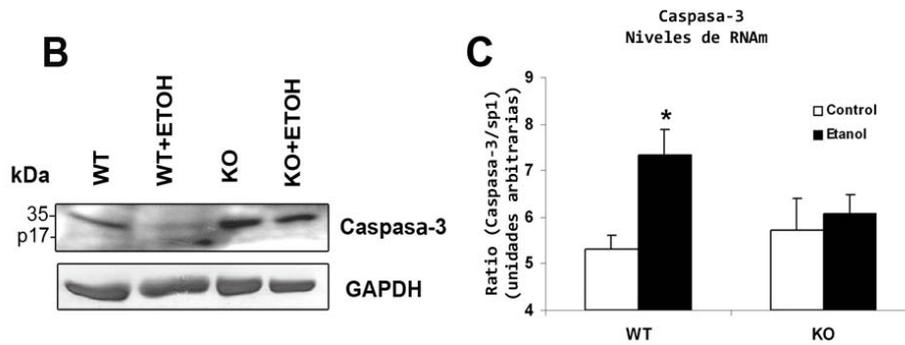


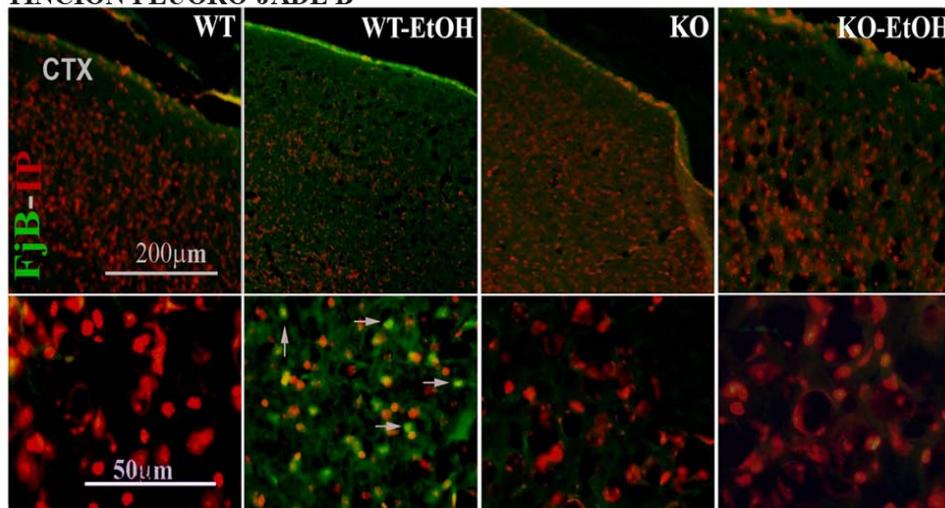
Figura 9: Efecto del alcohol en los niveles de caspasa-3 en córtex de ratones WT y TLR4-KO. A: Inmunoreactividad (DAB-Hx) para Caspasa-3 (CA-3), donde vemos un aumento significativo para los ratones WT con consumo crónico de etanol. Los ratones KO no revelaron cambios en ningún caso (escala: 200 μ m, detalle: 50 μ m). Las barras muestran [media \pm S.E.M.] con n=3/grupo de estudio. *** P <0.001 (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov). B: La inmunoelectrotransferencia de CA-3 muestra el fragmento activo de 17 kDa, en el córtex de ratones WT con consumo crónico de etanol. C: Niveles de ARNm para CA-3. Las barras representan 6 experimentos independientes, cuyos valores se expresan como [media \pm S.E.M.] * p <0.05 (Prueba-t student).

Los resultados que se muestran en la Figura 9, demuestran que un consumo crónico de etanol incrementaba la expresión de CA-3 en los hemisferios corticales de los ratones WT tratados con etanol. De hecho, el análisis de la inmunoreactividad de CA-3 fue altamente significativo en la corteza frontal medial de los ratones WT tratados con etanol respecto a los controles no tratados (Fig. 9A). Asimismo, los experimentos por inmunoelectrotransferencia, también mostraron una disminución en la intensidad de la banda de 35 kDa (procaspasa-3) junto con la aparición del fragmento de 17 kDa, fragmento activo resultante de la actividad de caspasa-3 (Fig. 9B), en corteza cerebral de ratones WT tratados con etanol. El fragmento de 17 kDa, no se observa en los otros grupos. Igualmente, los niveles de ARNm de caspasa-3, mostraron un incremento significativo en la corteza cerebral de los ratones WT tratados crónicamente con etanol (Fig. 9C), pero este incremento no se observó en los demás grupos. Todos estos resultados, indican que el tratamiento crónico de etanol causa una activación de la caspasa-3 en corteza cerebral de ratones WT, pero esta activación no se observa en cerebros de animales TLR4-KO, tal y como se demuestra mediante el uso de diferentes técnicas.

Para investigar si los cambios en caspasa-3 se correlacionaban con muerte neuronal, realizamos la tinción de Fluoro-Jade B. Esta tinción, se basa en un marcaje fluorescente de alta afinidad y marca la degeneración neuronal (Damjanac et al., 2007). Nuestros resultados indican que el tratamiento crónico de etanol, incrementaba significativamente el número de neuronas con fluorescencia verde, lo cual es indicativo de un aumento de degeneración neuronal, en corteza de ratones WT tratados con etanol, pero este incremento no se observa en corteza de animales TLR4-KO con el mismo tratamiento (Fig. 10).

A

TINCIÓN FLUORO-JADE B



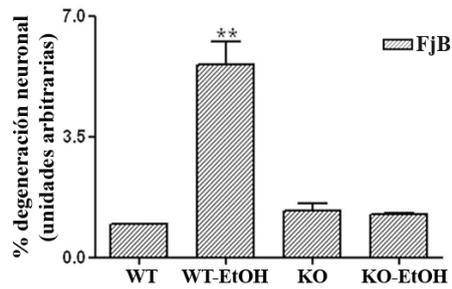
B

Figura 10: El alcohol induce degeneración neuronal dependiente de la función del TLR4. A: Tinción de Fluoro-Jade B (FJB, verde) e yoduro de propidio (IP, rojo) en córtex. B: La cuantificación de la tinción de FJB muestra una sobreexpresión en las neuronas que presentan neurodegeneración (flechas) en los ratones $TLR4^{+/+}$ (WT) tratados crónicamente con etanol, pero no se observaron cambios evidentes en los ratones $TLR4$ -KO con o sin tratamiento de alcohol. Escala: 200 μ m, con detalles, 50 μ m. Los valores representan la [media \pm S.E.M.] $n=3$ experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student).

Estos hallazgos corroboran nuestros resultados, los cuales demuestran que el consumo de alcohol incrementa la expresión y actividad de la caspasa-3 en corteza cerebral de ratones WT, pero este tratamiento no afecta a la expresión de caspasa-3 en animales $TLR4$ -KO. Por tanto, los resultados sugieren que la activación de los mediadores inflamatorios inducida por el etanol podría contribuir al daño y neurodegeneración neuronal asociada al consumo y/o abuso de alcohol, además de que el receptor $TLR4$ jugaría un papel crucial en estos eventos.

4.2 PAPEL DEL INFLAMASOMA NLRP3 Y LA RESPUESTA DE LOS TLR4 EN LA NEUROINFLAMACIÓN PRODUCIDA POR EL ALCOHOL.

4.2.1. El tratamiento de etanol activa el inflamasoma NLRP3 en astrocitos in vitro: Papel del TLR4.

Los inflamasomas representan un complejo de proteínas citosólicas que activan la caspasa-1, la cuál rompe la pro-interleuquina-1beta (pro-IL-1 β) a su forma activa IL-1, y esto desencadena un aumento en la liberación/secreción de las citoquinas IL-1 β e IL-18. Este complejo está compuesto por los receptores NLRs (del inglés, *Nucleotide-binding oligomerization domain like-receptors and Leucine-rich repeat*) que se asocian a un adaptador molecular denominado ASC (del inglés: *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*).

Entre los diferentes tipos de inflamasomas que existen, dependiendo del tipo de NLRs, uno de los más estudiados ha sido el NLRP3, por su implicación en la patología de varias enfermedades inflamatorias. De hecho, el NLRP3 se activa por una amplia variedad de estímulos, entre los que se encuentran diversas toxinas, ATP e incluso cristales de ácido úrico (MSU). Datos de los últimos años, indican la participación de los NLRP3 junto con los TLR4, en diferentes neuropatologías como la enfermedad de Alzheimer (Halle et al., 2008; Masters and O'Neill, 2011), Meningitis (Wu et al., 2010), etc. Además, ambos tipos de receptores se activan por distintos factores asociados a patologías o daño neural (PAMPs o DAMPs,) (Medzhitov, 2001; Beutler et al., 2006; Fritz et al., 2006).

Nuestros resultados anteriores, tanto en cerebros de animales tratados con etanol como en cultivos primarios de microglía y astrogía, demostraban que el etanol inducía la liberación de la citoquina IL-1 β , sugiriendo una posible participación del inflamasoma en este proceso. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si el etanol era capaz de activar al inflamasoma NLRP3, y si había una interacción entre este complejo citosólico y los TLR4 en la neuroinflamación asociada al consumo de alcohol.

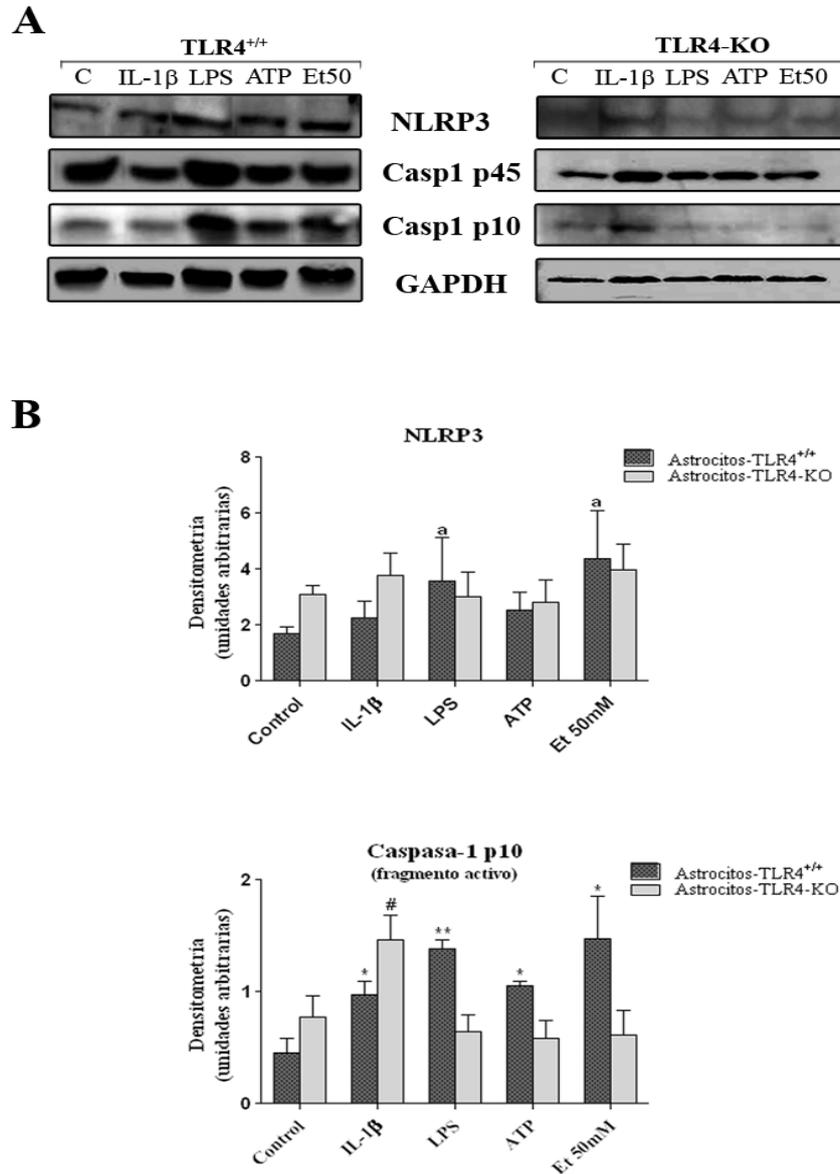


Figura 11: El tratamiento de etanol es capaz de activar el complejo citosólico NLRP3/Casp1 en cultivo primario de astrocitos. Usamos astrocitos corticales de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO, que se trataron durante 4 horas con los siguientes estimuladores; etanol (50mM), IL-1 β (1 μ g/mL), LPS (50ng/mL) y con ATP (5 μ M) como control positivo. A: Se analizaron los niveles de NLRP3 y Caspasa-1 (Casp1), tanto su forma inmadura (Casp1 p45) como su forma activa (Casp1 p10). Se usó GAPDH como control de carga. B: Cuantificación de NLRP3 y Casp1 p10. Las barras representan la [media \pm S.E.M.] n=3-5 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, # $p \leq 0,07$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).^a Estos tratamientos muestran una tendencia de activación de NLRP3 positiva.

Para abordar este objetivo utilizamos astrocitos corticales de ratones TLR4^{+/+} (WT) y TLR4-KO. Los astrocitos se incubaron durante 4 horas con etanol (50mM), IL-1 β (μ g/mL), y LPS (50ng/mL). Se utilizó como control positivo de activación del inflamasoma el adenosin tri-fosfato, ATP (5 μ M). Tras 4 h de tratamiento, se analizaron por inmunoelectrotransferencia los niveles de NLRP3, y de caspasa-1 (Casp-1) tanto su forma inmadura como su forma activa en lisados de astrocitos.

La figura 11, muestra que cuando los astrocitos de ratones TLR4^{+/+} se incuban con etanol (50mM), se produce una activación de la cascada de señalización de NLRP3/Casp1 a las 4 horas de tratamiento. De hecho, en la Fig. 11B se observa que el etanol aumenta la expresión del complejo NLRP3, al mismo tiempo que se produce una ruptura proteolítica de la Casp1, dando lugar a su forma activa de 10 kDa (Casp1 p10) en astrocitos-TLR4^{+/+}. Sin embargo, la activación de este complejo no ocurre en astrocitos corticales-TLR4-KO con el mismo tipo de tratamiento de alcohol. Asimismo, comprobamos que el tratamiento con LPS (50ng/mL), ligando específico de TLR4, potencia la respuesta del complejo NLRP3/Casp1, puesto que aumenta notablemente los niveles de Casp1 activa, evento que no ocurre en astrocitos-TLR4-KO.

Para corroborar estos resultados, se analizaron los niveles de IL-18, citoquina relevante en la activación del inflamasoma. Utilizando un ensayo de inmunoabsorción (ELISA), observamos que el ATP incrementa de forma significativa la liberación de esta citoquina a las 24 y a las 48 horas de tratamiento en astrocitos de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO (TLR4^{-/-}). El tratamiento con etanol (10 y 50 mM) también aumento la producción de IL-18 a las 24 horas de tratamiento en astrocitos de ratones WT, mientras que para los astrocitos de ratones TLR4-KO observamos que el aumento de la citoquina era sólo significativo a las 48h de tratamiento. Estos resultados, sugerían que el receptor TLR4 podría potenciar o acelerar la respuesta del inflamasoma.

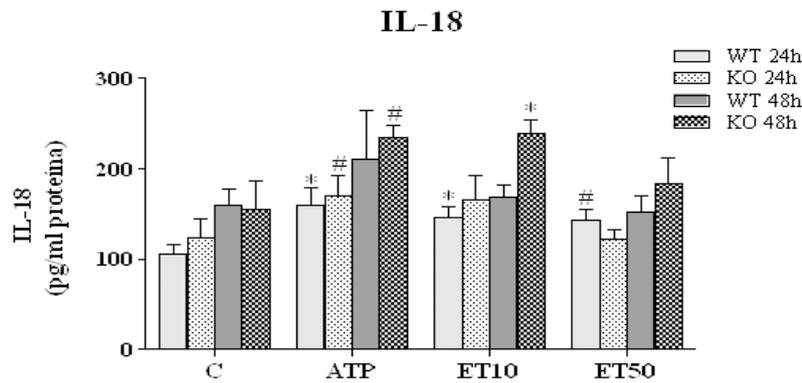


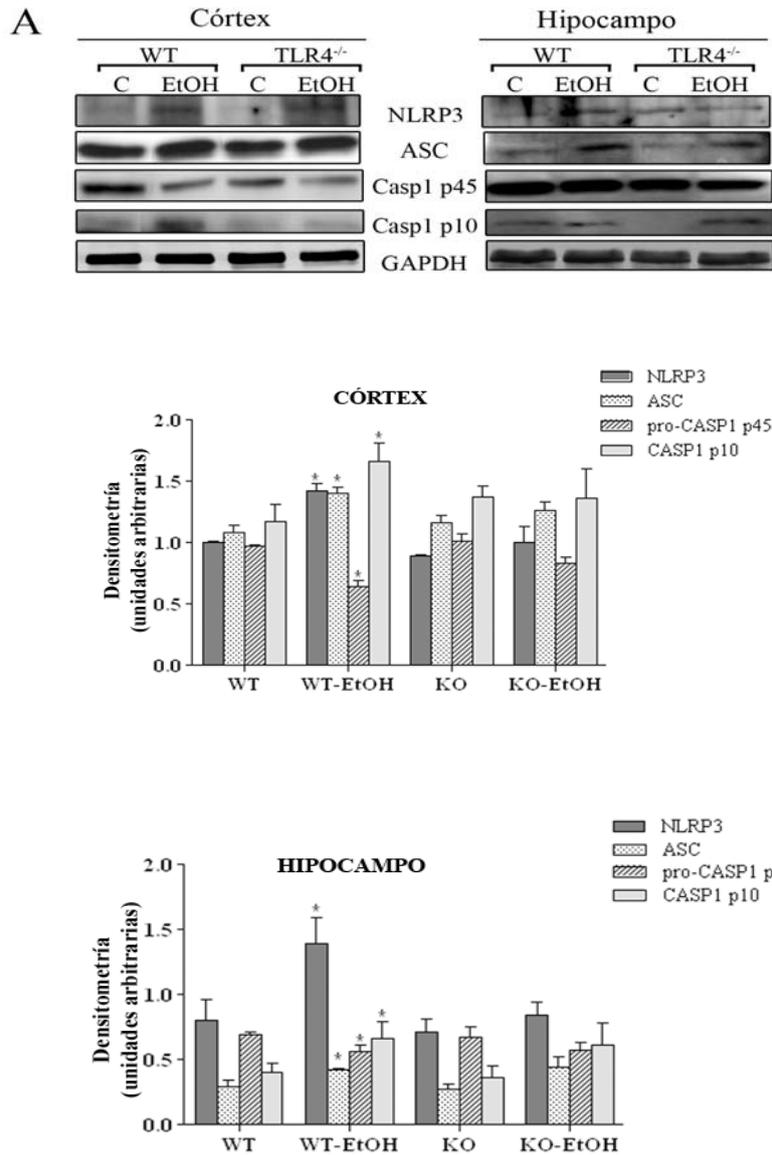
Figura 11: El etanol es capaz de activar a IL-18 “in vitro” en astrocitos de ratón WT y KO. La secreción de la citoquina IL-18 se analizó en el sobrenadante de los cultivos de astrocitos de ratones WT y KO. Los astrocitos se trataron con ATP, como control positivo, y con etanol a concentraciones 10mM y 50 mM (ET10 y ET50). La concentración en el medio de cultivo se analizó a las 24 y 48 horas de tratamiento. Las barras representan 6 experimentos independientes, cuyos valores se expresan como [media±S.E.M.] * $p < 0.05$, # $p < 0.07$ (Prueba-t student).

4.2.2. Activación del complejo NLRP3/Casp1 en el cerebro de ratones con consumo crónico de alcohol.

Nuestros resultados en cultivos de astrocitos sugieren que el etanol es capaz de activar al inflamasoma NLRP3 y que la ausencia del TLR4 disminuye o retrasa la liberación de citoquinas asociadas a la activación de este complejo. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si los efectos del etanol sobre el inflamasoma NLRP3 y su interacción con los TLR4 tienen lugar *in vivo* en cerebros de animales tratados crónicamente con etanol. Para ello, nos centramos en dos áreas cerebrales que son especialmente sensibles a los efectos neuroinflamatorios del etanol, como la corteza y el hipocampo de ratones TLR4^{+/+} y deficientes para este receptor (KO) tratados con o sin alcohol durante 5 meses.

Los resultados de inmunoelectrotransferencia, indican (Figura 13) que tanto la corteza cerebral como el hipocampo expresan las proteínas NLRP3, ASC y Casp1 p10 (forma activa). Los resultados también demuestran que el tratamiento crónico

con etanol induce la expresión de todas estas proteínas (Fig. 13A) en corteza cerebral e hipocampo de ratones TLR4^{+/+}. Sin embargo, el mismo tratamiento, sólo induce cambios significativos en ciertas proteínas del inflammasoma en corteza cerebral (NLR3, Casp1 activa e IL-18) e hipocampo (ASC, Casp1 activa e IL-18) de ratones deficientes en el receptor TLR4 (KO).



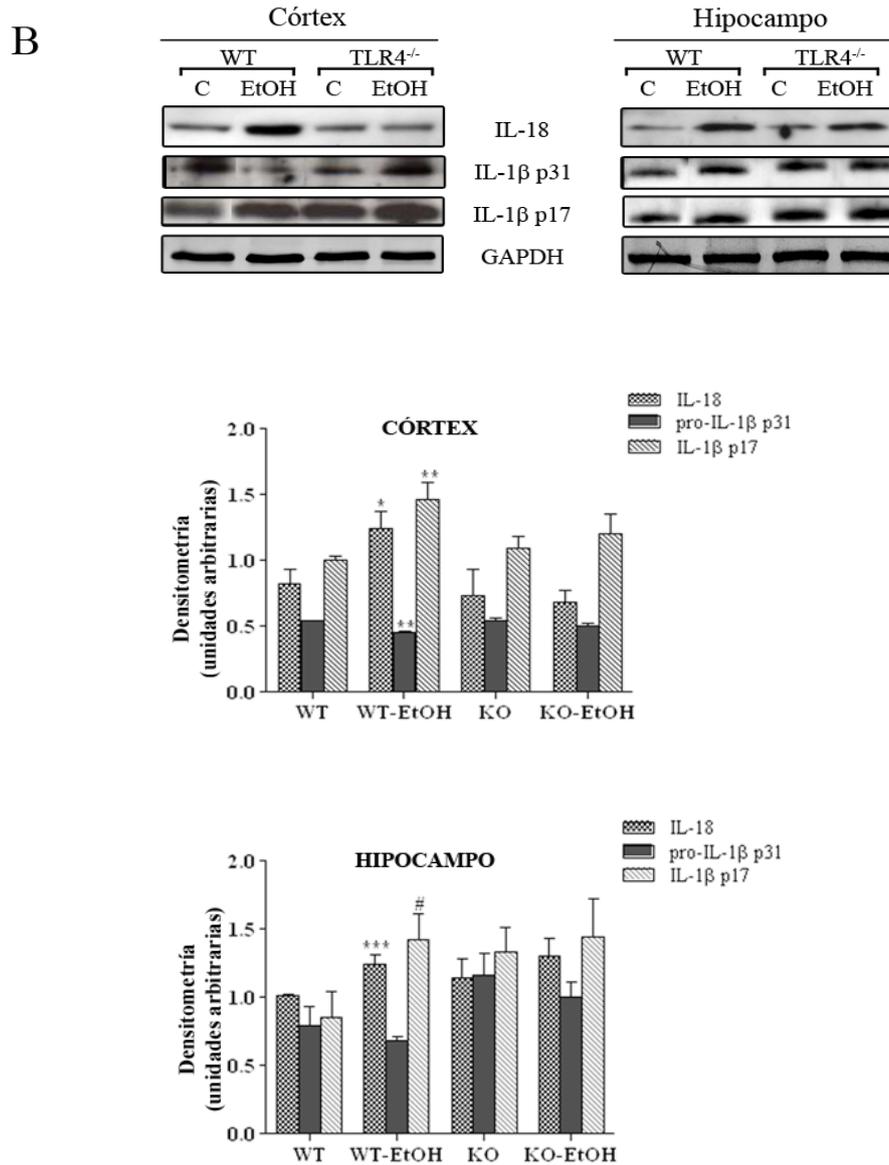


Figura 13: El consumo crónico de alcohol activa el complejo multiprotéico NLRP3 en ratones TLR4^{+/+} (WT) y ratones deficientes para TLR4 (KO). A, B: Observamos mediante inmunoelectrotransferencia que el alcohol activa las proteínas NLRP3, ASC e incluso los fragmentos activos de Casp1 (p10), IL-1β (p17) e IL-18 (p18) en corteza y en hipocampo de ratones TLR4^{+/+}. Además, el consumo de alcohol disminuye las formas inmaduras de la Casp1 (p-45) e IL-1β (p-31), aumentando las formas maduras y activas de estas proteínas en ratones TLR4^{+/+}. Sin embargo, solo algunos de estos efectos se observan en ratones TLR4-KO con consumo crónico de alcohol. Los valores representan la [media±S.E.M.] n=4-12 experimentos independientes. #, p ≤ 0,06 * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student).

Los análisis mediante inmunoelectrotransferencia revelaron que el consumo de alcohol incrementa significativamente los niveles de las formas activas de las interleuquinas IL-18 e IL-1 β p17 (forma activa) en la corteza e hipocampo (Fig. 13B) de ratones TLR4^{+/+}, mientras que la deficiencia en este receptor (TLR4-KO) el etanol no induce cambios significativos en los niveles IL-18 en la corteza, e incluso aminora los efectos IL-1 β (Fig.13B). Estos resultados se confirmaron mediante la medida de los RNAm utilizando PCR a tiempo real (Fig.14).

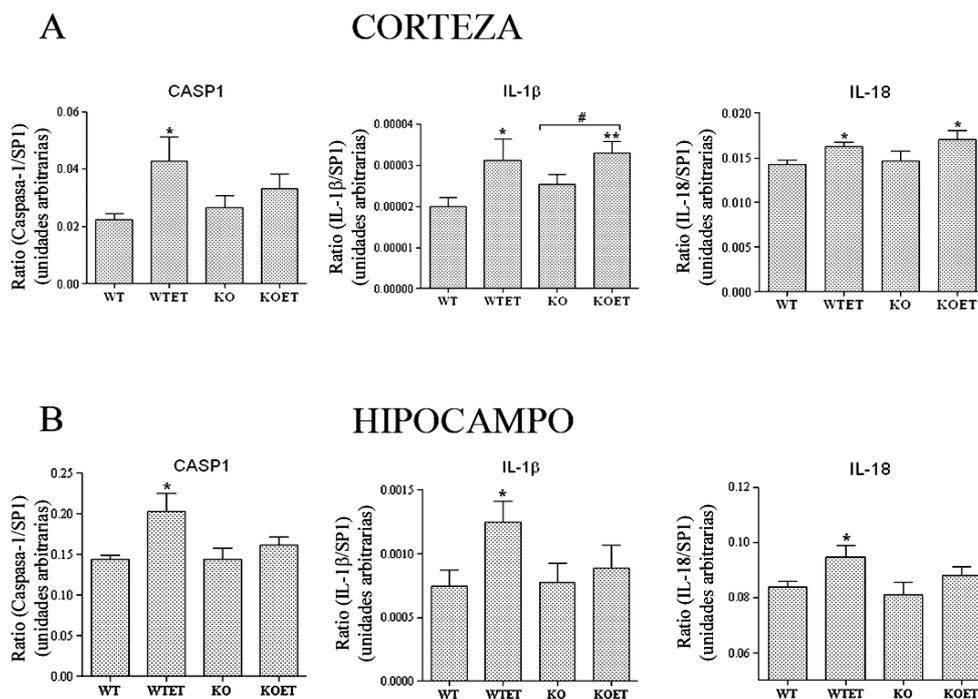


Figura 14: Efectos del tratamiento crónico de alcohol en los niveles de expresión génica para Caspasa-1(Casp1), IL-1 β e IL-18, en corteza (A) e hipocampo (B) de ratones TLR4^{+/+} y deficientes para el receptor, TLR4-KO. Los resultados se representan como la [media \pm SEM] de al menos una n=8-14 muestras independientes. [#,*] p<0.05, ** p-valor<0.01. (Test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Los resultados demostraron que el consumo de alcohol aumenta los niveles de RNAm de los genes Casp1, IL-18 e IL-1 β de los ratones TLR4^{+/+} en la corteza y en el hipocampo (Fig.14). Algunos de estos genes, como IL-1 β e IL-18, también se sobre-expresaron en corteza cerebral de ratones TLR4-KO, pero otros como los

Casp1 solo se observo una tendencia positiva. Sin embargo, los niveles de expresión tanto de la Casp-1, IL-1 β e IL-18 en hipocampo de estos ratones TLR4-KO, tan sólo muestran una ligera tendencia positiva, con respecto a los animales controles no tratados.

Para confirmar los anteriores resultados, utilizamos ensayos de inmunoabsorción (ELISA) para evaluar los niveles de citoquinas. Los resultados de la Fig. 15 muestran que el tratamiento crónico de alcohol incrementa los niveles de tanto de la citoquina IL-1 β como de la IL-18 en corteza cerebral de animales TLR4^{+/+}, mientras que en animales TLR4-KO, solo observamos incrementos significativos en la IL-1 β pero no en la IL-18.

En resumen, los resultados de este apartado indican que la presencia de los receptores TLR4 potencian la activación de NLRP3 en los efectos neuroinflamatorios del etanol, ya que la deficiencia del receptor TLR4 protege y reduce la activación del NLRP3 y sus consecuencias, como la liberación de citoquinas.

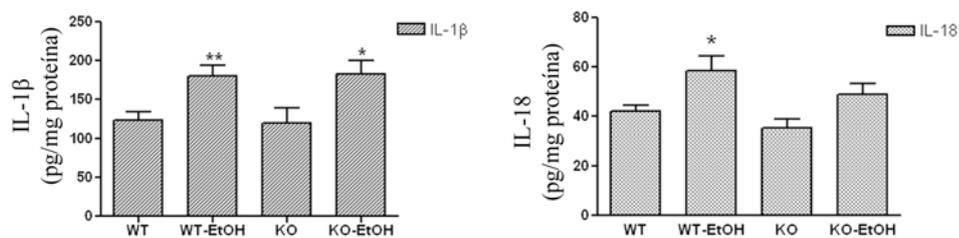


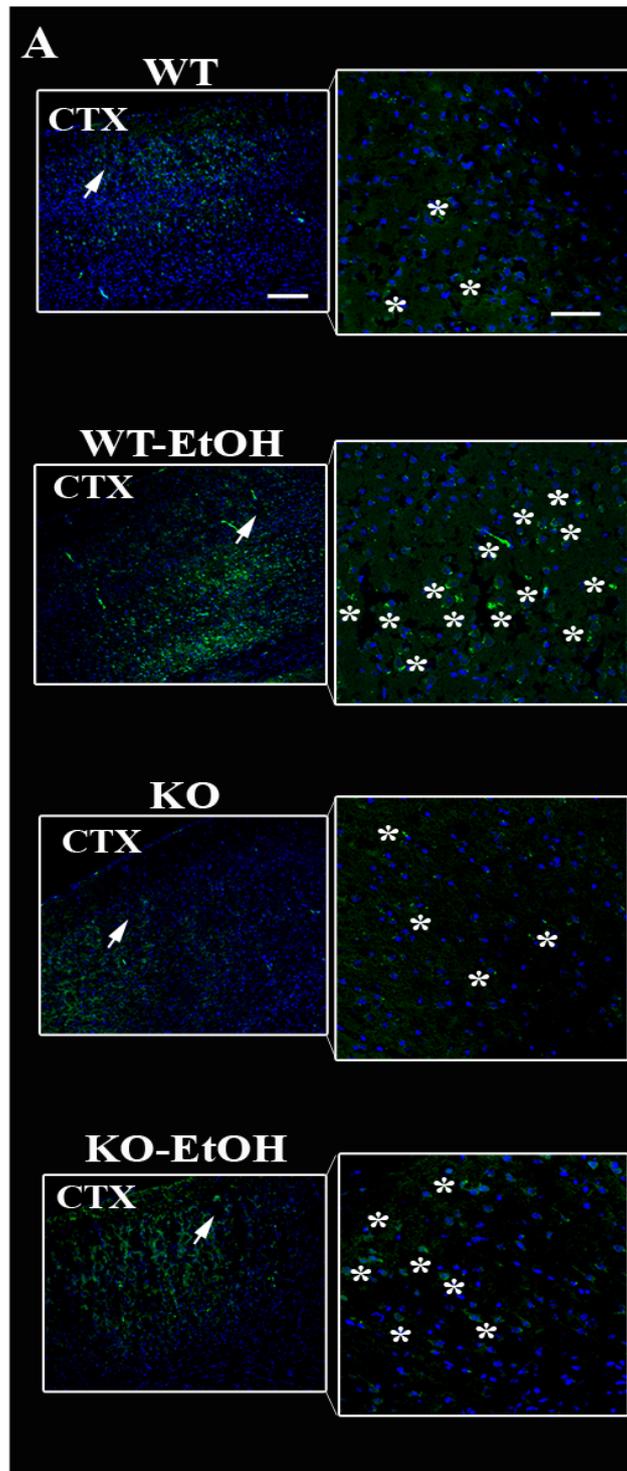
Figura 15: El tratamiento crónico de etanol induce la liberación de citoquinas IL-18 e IL-1 β asociadas al complejo NLRP3 en la corteza cerebral. Observamos, que existe una liberación de IL-1 β e IL-18 en cortezas de ratones TLR4^{+/+}, mientras que en ratones deficientes para el receptor TLR4, se aminora (IL-1 β) e incluso se inhibe en cierta medida (IL-18) la respuesta neuroinflamatoria de NLRP3. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

4.2.3. El TLR4 potencia la respuesta del complejo NLRP3/Casp1 en cerebro de animales tratados crónicamente con etanol: Estudio inmunohistoquímico.

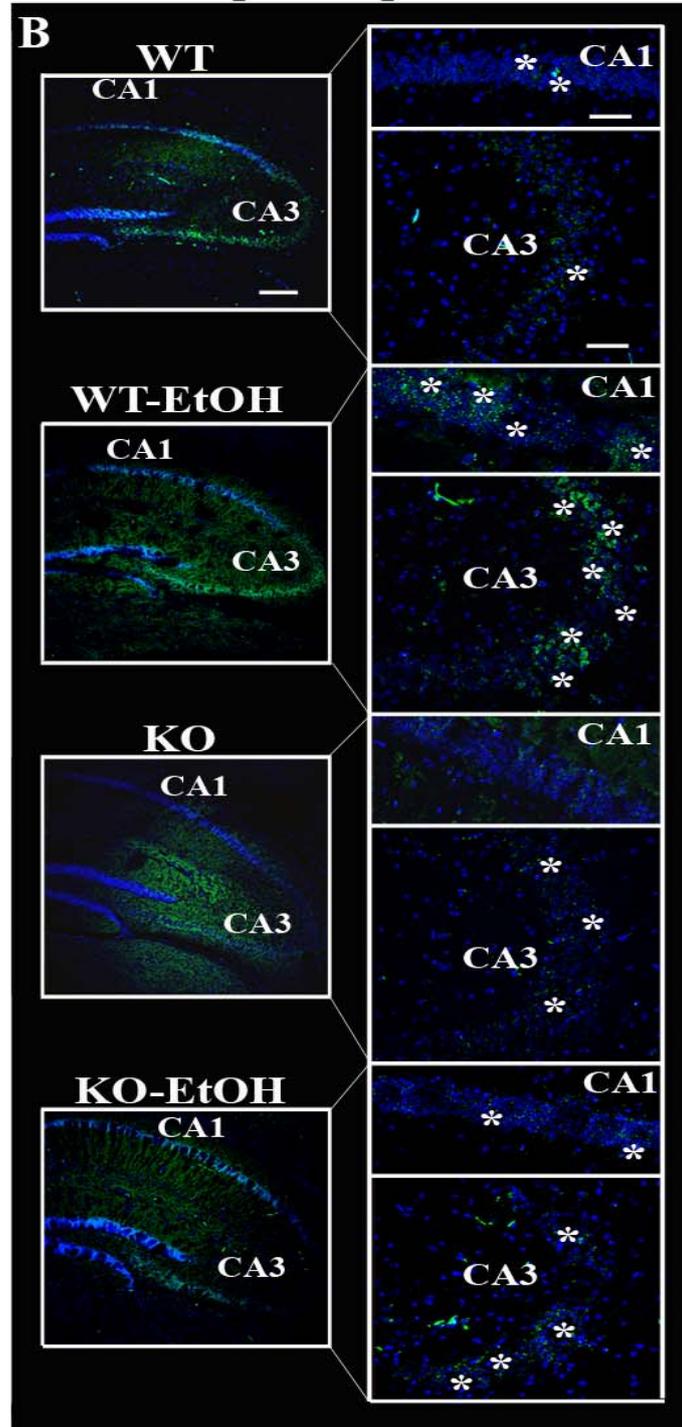
Para profundizar y confirmar los resultados anteriores sobre la activación del complejo NLRP3/Casp1 por el consumo crónico de alcohol y la posible potenciación del receptor TLR4 en estos efectos, realizamos estudios inmunohistoquímicos en corteza cerebral e hipocampo de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO.

El análisis mediante inmunofluorescencia (Fig. 16A) indica que el tratamiento con alcohol aumenta significativamente el número de células de Casp1 positivas (verde) tanto en corteza cerebral (Fig. 16A) como en el hipocampo (Fig. 16B) de ratones TLR4^{+/+}, cuando se comparan con los animales no tratados. Específicamente, la cuantificación en el número de células positivas para Casp1 demuestra un aumento significativo de células Casp1+ en el córtex (Fig. 16C) y en las regiones de hipocampo CA1 (Fig. 16D) y CA3 (Fig. 16E) de ratones TLR4^{+/+} e incluso se observan ciertos incrementos, en los ratones TLR4-KO (TLR4^{-/-}), cuando se comparan con los animales no tratados.

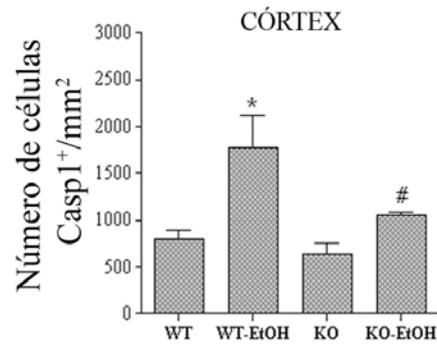
Córtex



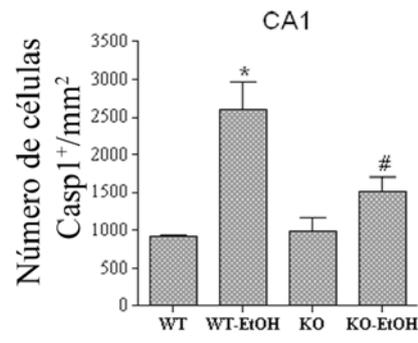
Hipocampo



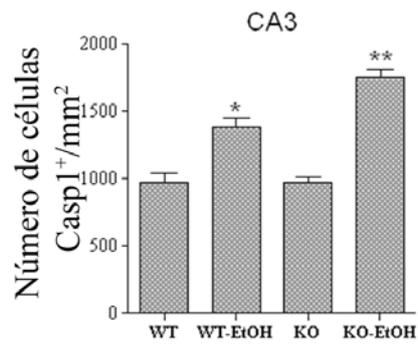
C



D



E



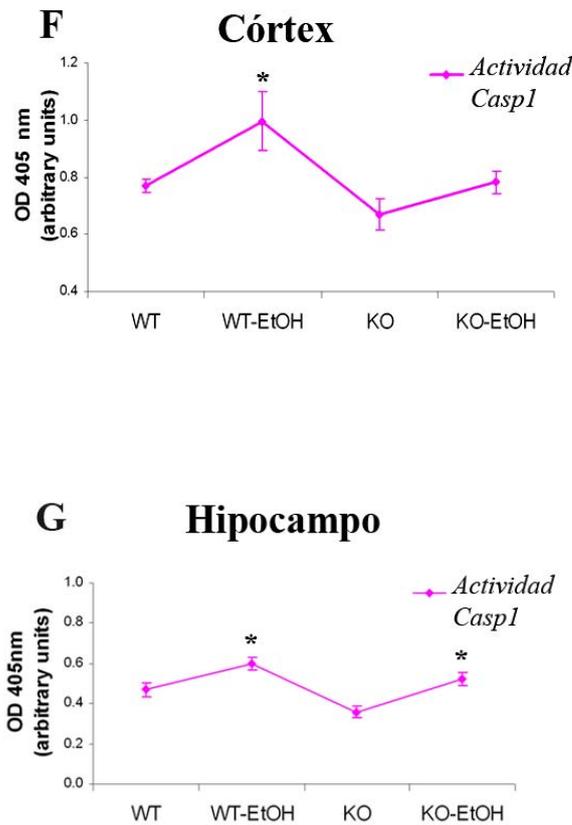


Figura 16: La actividad de caspasa-1 asociada con el complejo NLRP3 se incrementa con el consumo crónico de alcohol. A, B: Inmunofluorescencia en donde se muestran la expresión de Casp1 en corteza cerebral y en hipocampo de ratones $TLR4^{+/+}$ y $TLR4-KO$. Observamos que el alcohol incrementa el número de células Casp1 positivas (verde) en la corteza (A) e hipocampo (B), cuando se compara con los controles no tratados (escala= $200\mu m$ y sus ampliaciones, escala= $50\mu m$). C, D, E: Muestran la cuantificación de las células Casp1 positivas donde se observa un mayor número de células Casp1-positivas en los cerebros de ratones $TLR4^{+/+}$ que los $TLR4-KO$. Los datos muestran una $n=4$ experimentos independientes y se representan como la [media \pm SEM]. * p -valor <0.05 , # p -valor ≤ 0.06 , ** p -valor <0.01 . F, G: Muestran la actividad enzimática para Casp1. Observamos que el tratamiento con alcohol incrementa dicha actividad en corteza cerebral (F) e hipocampo (G) de ratones $TLR4^{+/+}$ pero no induce cambios significativos en corteza de mientras, aunque si en hipocampo de ratones $TLR-KO$. * $p < 0,05$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia, fueron corroborados mediante un ensayo colorimétrico para medir la actividad caspasa-1. Para este ensayo se utilizaron extractos proteicos de ambas zonas, corteza e hipocampo, procedentes del cerebro de ratones TLR4^{+/+} y deficientes para este receptor, TLR4-KO. Los resultados que se muestran en la Figura 16 (F, G) muestran que el tratamiento crónico de alcohol incrementa significativamente la actividad de la enzima Casp1 en el córtex e hipocampo de ratones TLR4^{+/+}, aunque en el caso de los ratones TLR4-KO, el aumento de la actividad solo se observó en hipocampo.

Estos resultados, indican que el consumo crónico de alcohol estimula la actividad de la caspasa-1, componente esencial en la activación del complejo inflamasoma NLRP3. Además, los resultados sugieren que el TLR4 potencia los efectos neuroinflamatorios del etanol sobre el inflamasoma NLRP3, ya que la deficiencia del receptor TLR4 (TLR4-KO) reduce en gran medida dichos efectos.

4.2.4. La activación del complejo NLRP3/ASC/Casp1 y el receptor TLR4 se asocian con infiltración leucocitaria y neuroinflamación.

La activación del complejo proteico NLRP3 se asocia a procesos inflamatorios, y la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β e IL-18). Cuando se produce una inflamación, los macrófagos se activan mediante señales químicas, como puede ser el interferón gamma (IFN- γ), conduciendo a que aumento en la producción de moléculas de histocompatibilidad de tipo II (MHCII), que se preparan para presentar antígenos y eliminar los posibles patógenos. Además, algunos estudios relacionan la inflamación con un aumento en la IL-33, una citoquina que pertenece a la superfamilia de la IL-1, y que conserva ciertos dominios con otros miembros como IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra y el IL-18 (Lingel and Fairbrother, 2009) y actúa como marcador temprano de inflamación (Palmer and Gabay, 2011).

Por lo tanto, con el fin de determinar si el consumo crónico de alcohol era capaz de desencadenar un proceso inflamatorio en cerebro a través de la presencia de infiltrados en el cerebro, y su posible asociación con el receptor TLR4 y el complejo NLRP3, determinamos los niveles de las citoquinas IL-33 e IFN- γ mediante ELISA (Fig.17A) (17B) en corteza cerebral de los ratones WT y TLR4-KO tratados y no tratados con etanol.

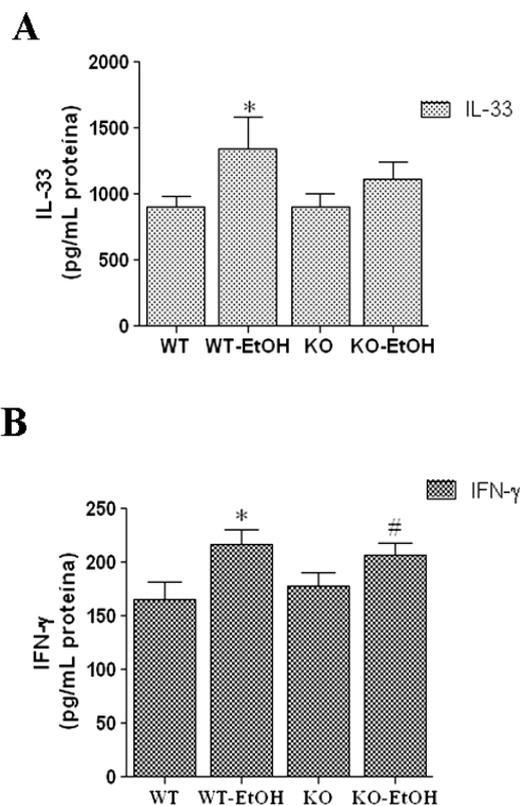
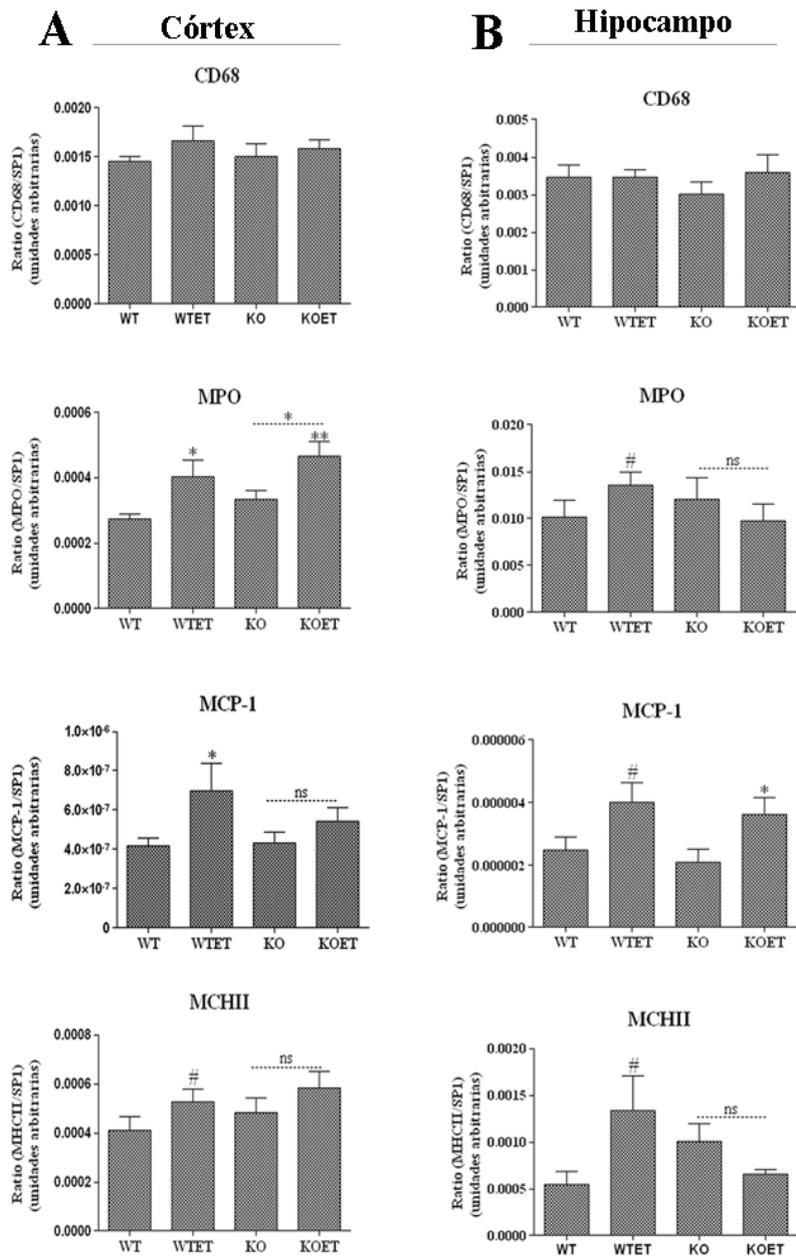


Figura 17: El tratamiento crónico de alcohol produce incrementa los niveles de las citoquinas IL-33 e IFN- γ . El tratamiento con alcohol incrementa significativamente los niveles tanto de IL-33 (A) como de IFN- γ (B) en corteza cerebral de ratones TLR4^{+/+}, pero no alteran dichos niveles de citoquinas en corteza cerebral de ratones TLR4. Los niveles de citoquinas se midieron utilizando ensayos de inmunoabsorción (ELISA). Los valores representan la [media \pm SEM] de al menos 5-9 experimentos independientes. * $p < 0,05$, # $p \leq 0,05$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Al mismo tiempo, para valorar nuestra hipótesis de los posibles infiltrados en cerebro tras un consumo crónico de alcohol, analizamos mediante RT-PCR los niveles de expresión de CD68, MPO, MCP-1 y MHCII, tanto en la corteza cerebral (Fig.18A), como en el hipocampo (Fig. 18B), zonas que previamente habíamos visto que presentaban daño ante un consumo crónico de alcohol. Los resultados de la figura 18 indican que el consumo crónico de alcohol induce un aumento significativo del gen de la MCP-1- en corteza y en hipocampo de ratones WT, y en hipocampo de ratones TLR4-KO. Esta quimiocina, parece que actúa como guía en

los procesos de migración celular y está relacionada con la activación de los macrófagos tisulares. De hecho, en corteza cerebral e hipocampo de ratones WT se observa un aumento significativo en los niveles de MHCII-RNA_m (complejo de histocompatibilidad II, importantes en la respuesta inmunológica del organismo frente a patógenos), y MPO-RNA_m (mieloperoxidasa). Sin embargo, los ratones TLR4-KO tratados crónicamente con etanol, no muestran variaciones en los niveles de expresión de MHCII, pero si incrementan los niveles de MPO-RNA_m en corteza cerebral. Por otro lado, en el caso del hipocampo (Fig. 18B), observamos un aumento moderado de la expresión génica de MPO, MCP-1 y MHCII en los ratones TLR4^{+/+} con consumo crónico de alcohol, mientras que en los ratones TLR4-KO los cambios no fueron significativos, a excepción de la quimiocina MCP-1. En ambos casos, tanto en hipocampo como en el córtex cerebral, el gen CD68 no presentó variaciones significativas.

Teniendo en cuenta todos estos hallazgos, decidimos determinar qué tipo de infiltrados se presentaban en la corteza cerebral de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO con un tratamiento crónico de alcohol. Para ello, evaluamos mediante inmunoelectrotransferencia (Fig. 18C) los niveles de leucocitos (CD45), neutrófilos (MPO) e incluso de una proteína clásica de la membrana plasmática de los macrófagos (CD68).



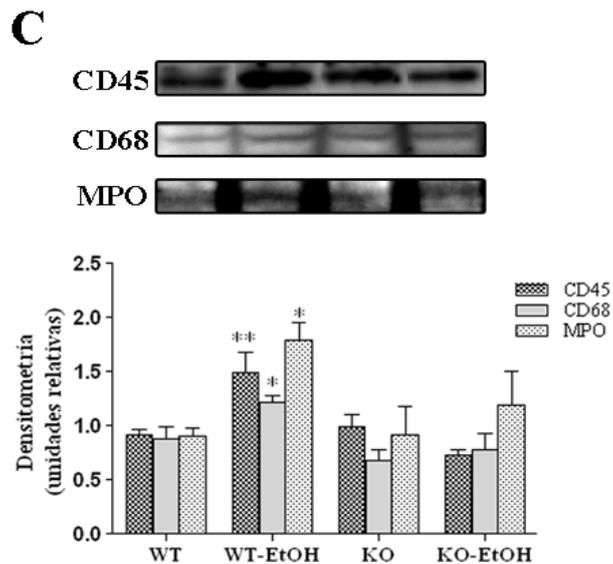
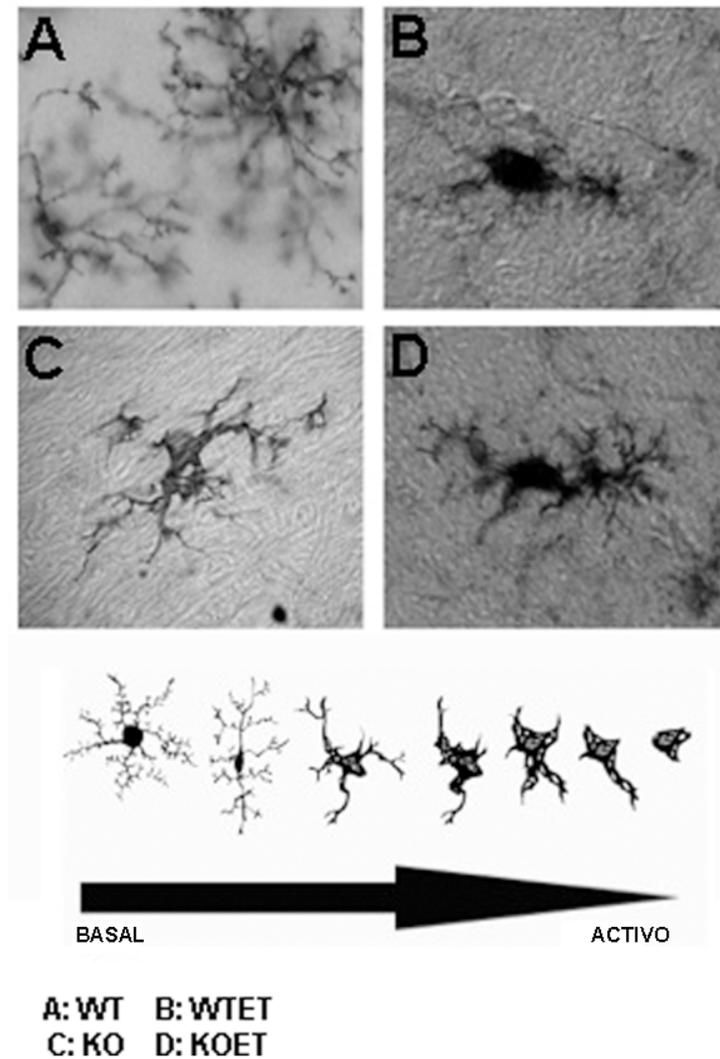


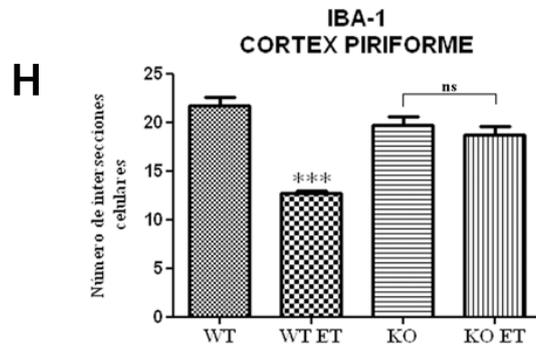
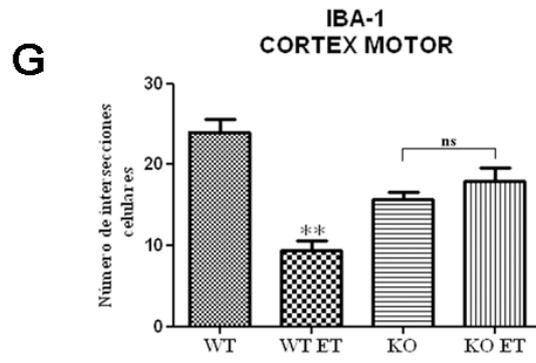
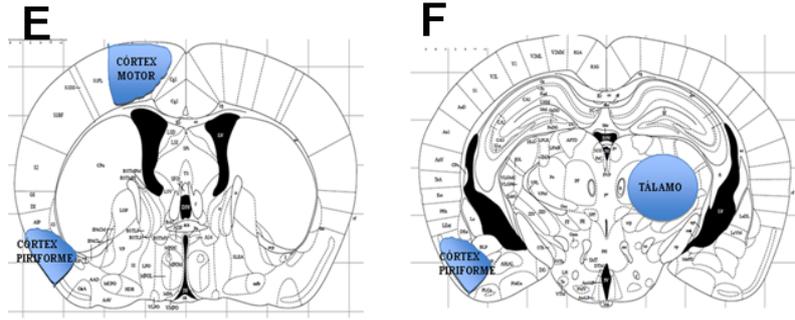
Figura 18: El consumo crónico de alcohol altera los niveles de expresión de genes y proteínas que participan en los procesos de neuroinflamación e infiltración en el cerebro de los ratones *TLR4^{+/+}* y *TLR4-KO*. En la figura se presentan los niveles de expresión génica (RNAm) de CD45, CD68, MPO, MCP-1 y MHCII tanto en corteza (A) como en hipocampo (B). Niveles de proteína de CD45, CD68 y MPO en la corteza cerebral de los ratones *TLR4^{+/+}* y *TLR4-KO* (C). Las barras representan la [media± SEM] de al menos 4-8 experimentos independientes. # $p \leq 0,06$ * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

El análisis de las distintas proteínas (Fig. 18C), tanto CD45, CD68 y MPO, reveló que el tratamiento crónico de etanol incrementa los niveles de estas proteínas en la corteza cerebral de ratones *TLR4^{+/+}*, pero no se observan cambios significativos en la misma área de cerebro de ratones *TLR4-KO*. Estos resultados, sugieren que la ausencia de TLR4 ejerce cierta protección frente a fenómenos asociados a los procesos neuroinflamatorios causados por el consumo de alcohol, como es la presencia de infiltrados de leucocitos, macrófagos y neutrófilos.

Para confirmar los anteriores resultados realizamos estudios inmunohistoquímicos. Los resultados de la Figura 19 muestran que el consumo de alcohol causa una activación de la microglia (*iba-1⁺*), que podría asociarse con la estimulación del complejo de histocompatibilidad II (MHCII (OX6) tal y como demuestra la Fig. 18A. De hecho, cuando evaluamos la morfología de la microglia observamos como tras el consumo de alcohol las células *iba-1⁺* pasan de un estado

basal a un estado activado (Fig. 19A). Específicamente, la microglía (células iba-1⁺) experimenta un cambio morfológico que se manifiesta por la presencia de células ameboides con escasas ramificaciones, disminuyendo el número de intersecciones celulares (Fig. 19B). Por tanto, una activación de la microglía, se refleja una disminución en el número de intersecciones celulares, tal y como observamos en córtex motor, córtex piriforme y tálamo de animales TLR4^{+/+} tratados con alcohol (Fig.19G-I). No observamos cambios significativos, en el número de intersecciones celulares entre animales TLR4-KO tratados o no tratados con etanol (Fig 19 G-I), aunque si que se observan cierto grado de activación en algunas células iba-1⁺.





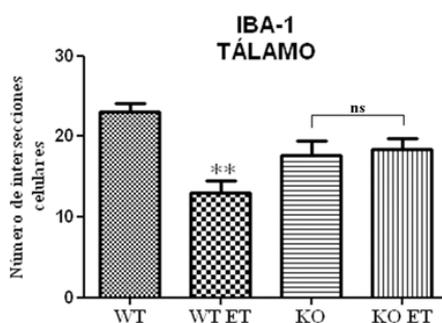


Figura 19: La deficiencia en TLR4 protege frente a la activación microglial (Iba-1) causada por el consumo alcohol en la corteza piriforme, motora y el tálamo. Observamos el paso de la microglía a su forma normal a la activada, disminuyendo el número de intersecciones celulares. A: Control WT; B: WTET; C: KO; D: KOET. El consumo de alcohol activa a la microglía y reduce el número de interconexiones celulares en Córtex motor (G) Córtex piriforme (H) y Tálamo (I) de animales WT, pero no se observan cambios significativos en TLR4-KO tratados con etanol. La cuantificación de estas intersecciones celulares en el córtex motor (G), piriforme (H) y tálamo (I) se representa como la [media±SEM] de al menos 3 experimentos independientes. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov-Smirnov o Prueba t-student). *Figuras modificadas a partir del Atlas creado por K. Franklin and G. Paxinos, 1997.

Los resultados de este apartado, sugieren que el consumo crónico de alcohol daña o altera la barrera hematoencefálica facilitando la infiltración de linfocitos, neutrófilos y monocitos, que podrían inducir activación de la microglía y del inflammasoma NLRP3. Los resultados también demuestran que el TLR4 potencia muchos de estos eventos asociados al consumo de alcohol, ya que la deficiencia en este receptor aminora e incluso protege del daño neuroinflamatorio que causa el alcohol

4.3 EL RECEPTOR TLR4 PARTICIPA EN LA DESMIELINIZACIÓN ASOCIADA AL ABUSO DE ALCOHOL EN EL CEREBRO.

4.3.1. El tratamiento crónico de etanol disminuye los niveles de las proteínas de la mielina; papel de los receptores TLR4.

Nuestros anteriores resultados habían demostrado que el etanol, mediante la activación de la cascada de señalización de TLR4 en las células gliales, puede desencadenar la producción de mediadores inflamatorios en el cerebro e inducir daño cerebral (Fernandez-Lizarbe et al., 2009; Alfonso-Loeches et al., 2010). Trabajos recientes, indican que el abuso de alcohol causa desmielinización y desestructuración de la mielina en alcohólicos. Además, las últimas evidencias, sugieren que muchas enfermedades neurodegenerativas cursan con neuroinflamación y desmielinización (Felts et al., 2005; Marta et al., 2009; Sloane et al., 2010). Por tanto, nos planteamos abordar una nueva hipótesis basada en los datos anteriores, y propusimos que “el etanol a través de la activación de los TLR4 induce neuroinflamación, y a su vez causa desmielinización “.

Para abordar esta hipótesis, lo primero que evaluamos fue medir los niveles de diferentes proteínas implicadas en los procesos de mielinización en distintas regiones cerebrales de los ratones WT y TLR4-KO, sometidos a un consumo crónico de alcohol durante 5 meses. Mediante estudios de inmunoelectrotransferencia, demostramos que el tratamiento crónico de etanol reduce significativamente varias proteínas que participan en el proceso de mielinización, en varias áreas cerebrales de los ratones WT tratados con alcohol. Específicamente, analizamos las siguientes proteínas: la proteína proteolipídica (PLP), proteína básica de la mielina (MBP), glicoproteína asociada a la mielina (MAG), glicoproteína oligodendrocítica de la mielina (MOG), la 2'-3'-nucleótido cíclico fosfohidrolasa (CNPasa) y el proteoglicano condroitín sulfato (NG2). En la Figura 11, se muestra como el consumo de alcohol reduce significativamente las diferentes proteínas en (A) corteza cerebral (CTX), (B) hipocampo y (C) cuerpo calloso (CC) de ratones WT tratados con alcohol durante 5 meses. Concretamente, los niveles de CNPase en el CC fueron los que no se vieron afectados por el tratamiento de alcohol.

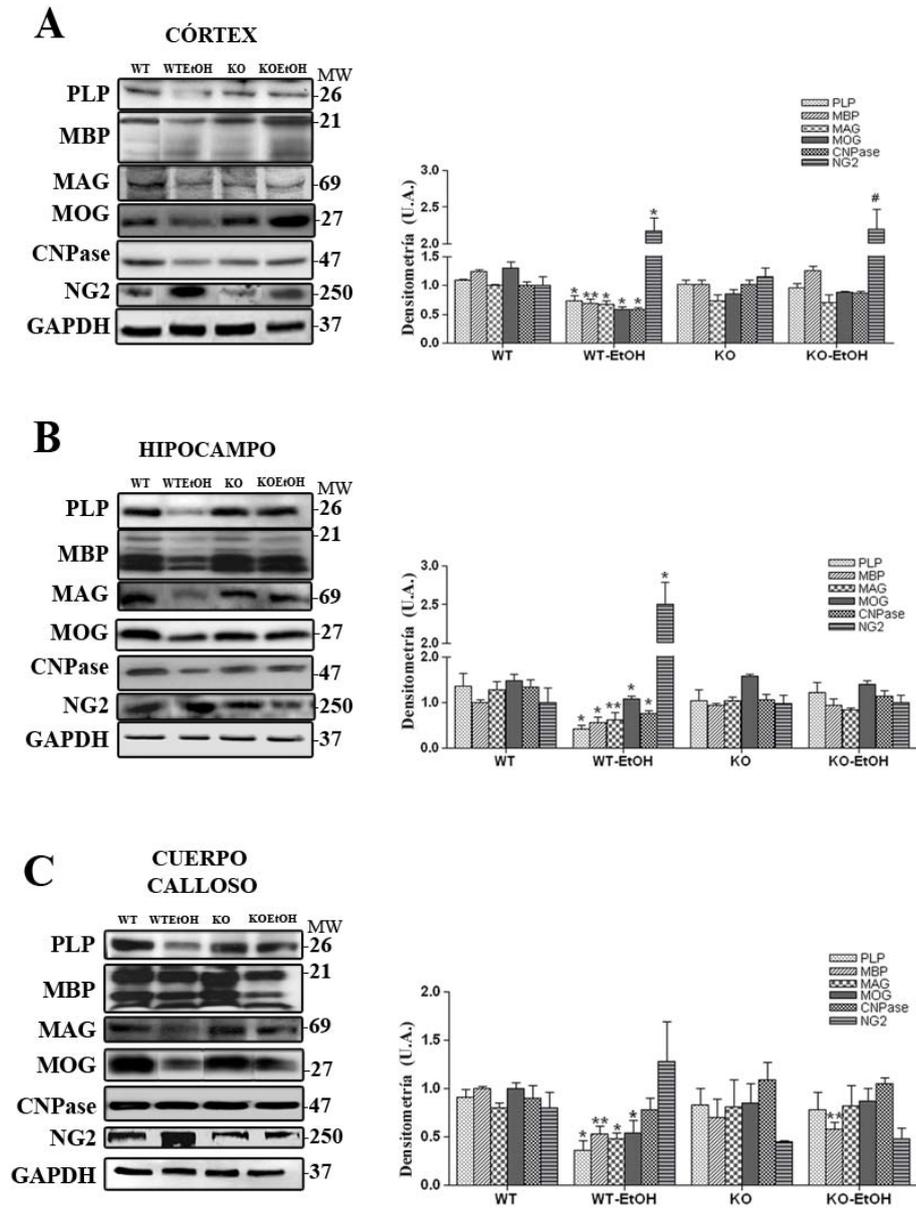


Figure 20: EL consumo crónico de etanol disminuye los niveles de proteínas en la mielina. Inmuno-electrotransferencia representativas y cuantificación densitométrica de los datos obtenidos para la PLP, MBP, MAG, MOG, CNPase y NG2 en la corteza (A), hipocampo (B) y cuerpo calloso (C) de ratones WT y TLR4-KO, tratados y no tratados con etanol. GAPDH se presenta como control de carga. Los valores representan la [media±S.E.M.], con una n=8 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los niveles de las proteínas de la mielina estudiadas en el caso de los ratones TLR4-KO con el mismo tratamiento de alcohol que los animales WT (Fig. 20 A, B, C), a excepción de la proteína MBP, en la que se observó una reducción significativa en el CC de estos ratones. Un dato interesante, es que el tratamiento con alcohol incrementó significativamente los niveles de NG2, proteoglicano que es expresado por las células precursoras de oligodendrocitos, en el CTX y el hipocampo de los ratones WT y en la CTX de los ratones TLR4-KO (Fig. 20 A, B).

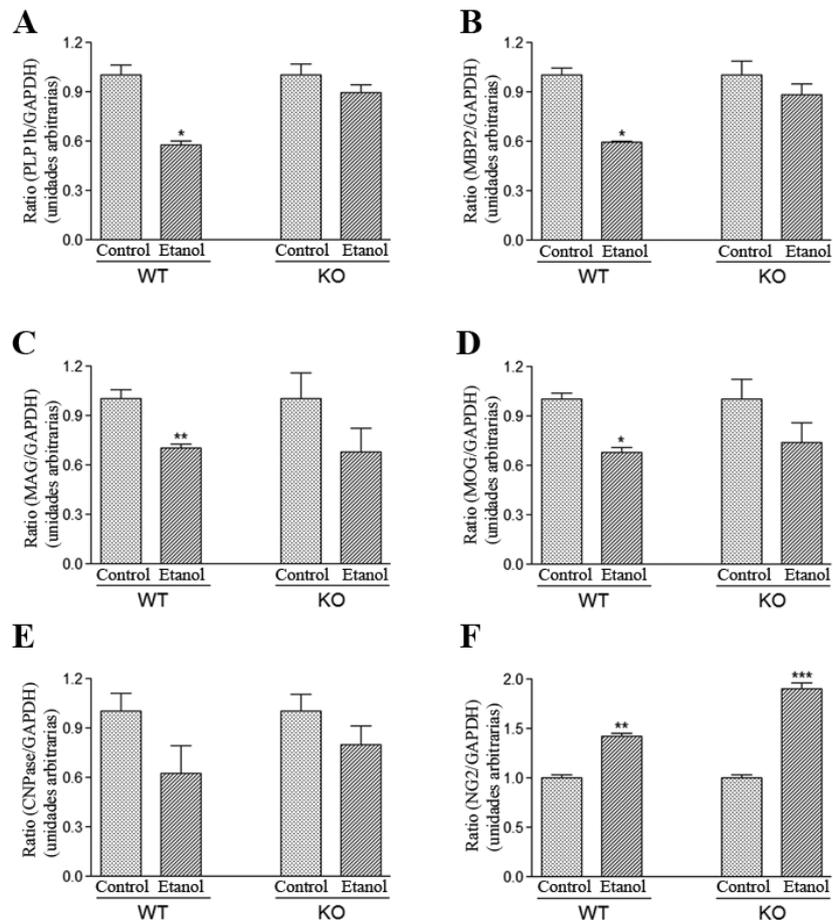


Figure 21: El etanol altera los niveles de ARNm en el córtex cerebral. Niveles de ARNm que codifican las proteínas PLP1b, MBP2, MAG, MOG, CNPase y NG2 en CTX de ratones WT y TLR4-KO, tratados y no tratados con etanol. Los valores representan la [media±S.E.M], n = 8 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Prueba t-student).

Para profundizar en las diferencias observadas de la expresión de las diferentes proteínas, analizamos los niveles de ARNm que codificaba para cada una de las proteínas estudiadas, en una de las regiones cerebrales que se afectan principalmente por el alcohol, como es la corteza cerebral.

Los resultados obtenidos, confirman los cambios en los niveles de proteínas que se observan en los diferentes grupos, obteniendo una disminución en la expresión génica de los ratones WT tratados con etanol, de la mayoría de las proteínas anteriormente mencionadas (Fig. 21), mientras que no obtuvieron cambios significativos en dichas proteínas para los ratones TLR4-KO (Fig. 21 A-D). Sin embargo, la reducción en los niveles de la CNPase en corteza de los ratones WT tratados con etanol no se correlacionó con los niveles de ARNm de CNPase, ya que estos no sufrieron cambios (Fig. 21E). Del mismo modo, nuestros resultados confirman que los niveles NG2 y de su ARNm aumentan en el CTX de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO tratados con etanol, cuando se comparan con sus respectivos controles (Fig. 21F).

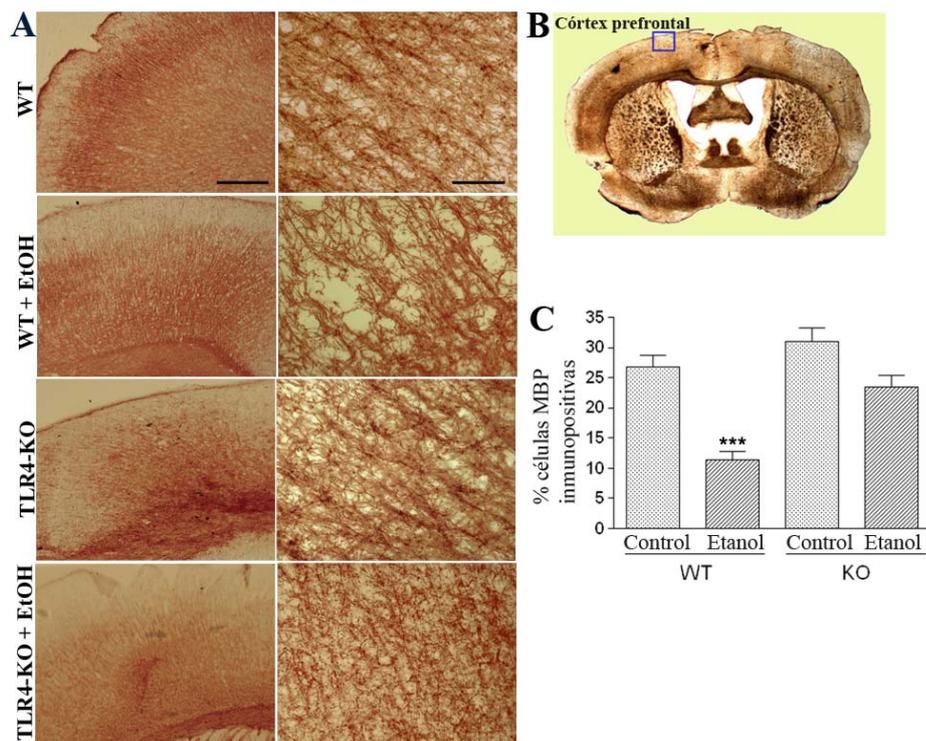
Estos resultados, sugieren que la activación en la señalización de TLR4 y la sobreexpresión de mediadores inflamatorios que se inducen por consumo crónico de alcohol en cerebro de ratones WT (Fernandez-Lizarbe et al., 2009; Alfonso-Loeches et al., 2010), se asocian con una disminución de algunas proteínas implicadas en procesos de mielinación, como por ejemplo, PLP, MOG, MAG, etc. Asimismo, puesto que las células precursoras de oligodendrocitos que expresan NG2 (Nishiyama et al., 2009; Kang et al., 2010), suelen presentar cambios importantes en respuesta a un daño o proceso desmielinizante (Chang et al., 2000; Nishiyama et al., 2009), nuestros resultados sugieren que una sobreexpresión de NG2, podría ser un mecanismo compensatorio como respuesta al daño cerebral y desmielinización que induce el alcohol.

4.3.2. El abuso de alcohol altera la morfología de la mielina, reduce el número de fibras miélicas y causa muerte neuronal.

Para profundizar en las alteraciones de la mielina causadas por el consumo de alcohol, realizamos diversos estudios inmunohistoquímicos, para poder valorar posibles modificaciones en su estructura. Para ello, evaluamos el contenido y

distribución de las fibras mielínicas marcadas con MBP en la corteza prefrontal. Los resultados de la inmunohistoquímica de MBP, revelaron que el tratamiento crónico de alcohol induce importantes alteraciones estructurales, e incluso una notable disminución en la inmunoreactividad de MBP (Fig. 22 A, C) en la corteza prefrontal (PFC) de los ratones WT crónicos, mientras que sólo se evidencian cambios leves en ratones TLR4-KO con el mismo tratamiento de alcohol (Fig. 22 A, C).

Además, evaluamos el número de fibras positivas para MBP en el córtex motor primario de estos ratones (Fig. 22E) calculando el porcentaje de fibras MBP positivas (Fig. 22F). Nuestros resultados muestran una significativa reducción en el número de fibras positivas para mielina en los ratones WT tratados con alcohol durante los 5 meses, mientras que cambios menores aunque significativos fueron detectados en los ratones TLR4-KO crónicos (Fig. 22D, F) comparando con sus respectivos controles.



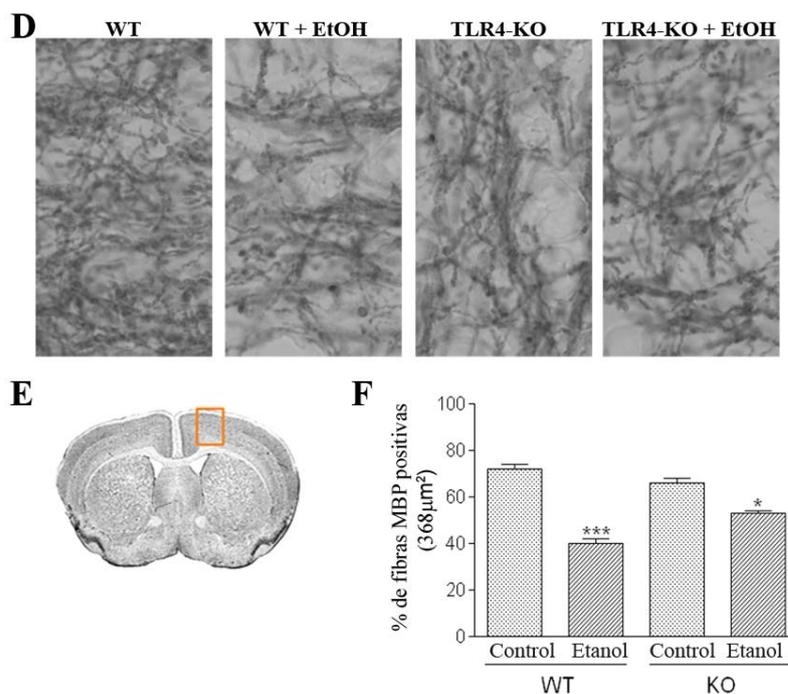


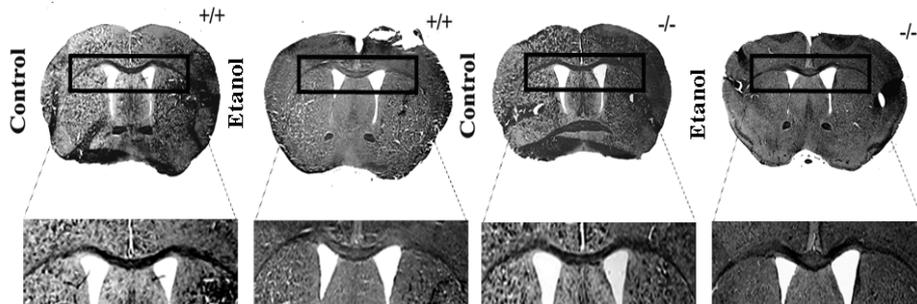
Figura 22: Inmunohistoquímica de MBP en el córtex prefrontal (PFC) (A, B, C) y primario motor (D, E, F) de ratones WT y TLR4-KO, tratados y no tratados crónicamente con etanol. A, B, C: El tratamiento de etanol disminuye los niveles de inmunoreactividad y altera la distribución de MBP en el PFC (B) de ratones WT, mientras que solo se observan cambios leves en los ratones TLR4-KO (C). D, E, F: El número de fibras MBP positivas se cuantificó en el córtex primario motor (E). El tratamiento crónico de etanol disminuye el número de fibras MBP⁺ en los ratones WT y, en menor grado a los TLR4-KO (F). Los resultados se obtuvieron contando el número de fibras de un área total de 368 μm²/sección, donde se cuantificaron al menos 5-6 campos. n= 3-4 experimentos independientes/grupo. Escala: 200 μm. Ampliaciones, 50 μm. Los valores representan la [media±S.E.M.] y se representan en porcentaje. *p<0.05, ***p<0.001 (Test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov).

Los resultados sugieren un posible papel de la señalización del receptor TLR4 en los cambios morfológicos y en las alteraciones estructurales de la mielina que se producen ante un abuso de alcohol.

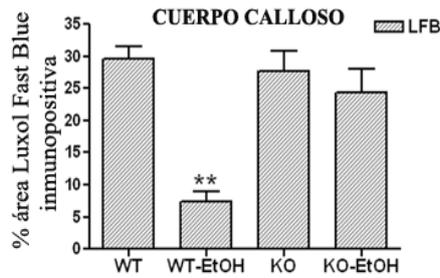
Además, para profundizar en las alteraciones de mielina observadas, realizamos las tinciones de *luxol fast blue* (LFB) (Fig. 23A, B) y de *Nissl* (Fig. 23C, D), que nos permitió determinar el grado de mielinización, las alteraciones axonales y la consecuente muerte neuronal. La tinción del LFB, demostró que el tratamiento crónico de etanol, reduce significativamente la cantidad de mielina en el CC de los

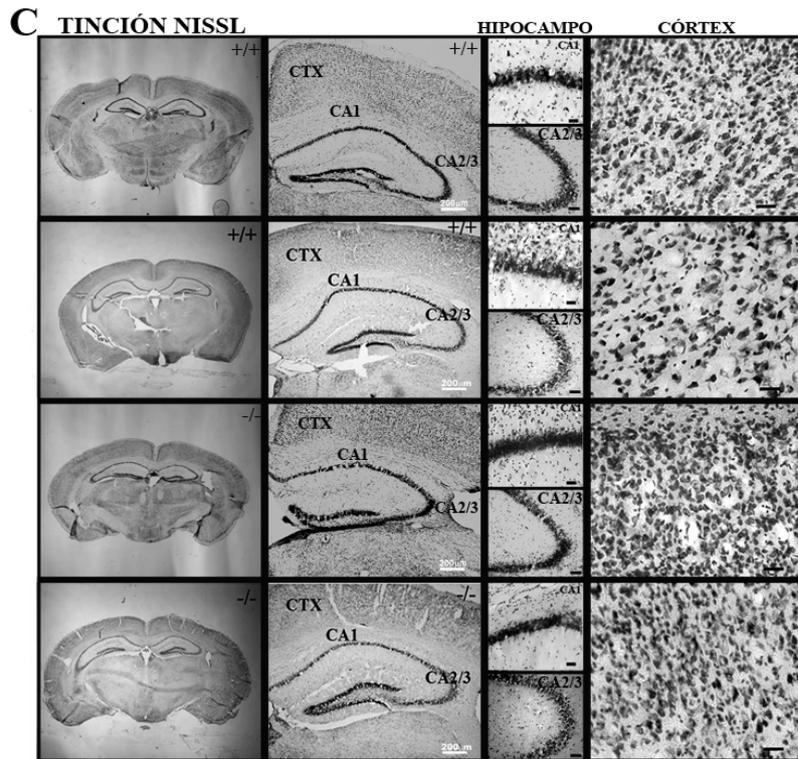
ratones WT (Fig. 23B). Del mismo modo, el abuso de alcohol disminuyó significativamente el número de neuronas, como demuestra la tinción de *Nissl* (Wang et al., 2001), tanto en la corteza como en las subregiones CA1 y CA2/3 de hipocampo en los ratones WT (Fig. 23D). Además, con la tinción de Nissl, pudimos evidenciar cómo las neuronas dañadas y oscuras muestran ciertas características entre las que se encuentran los fenómenos de picnosis y la reducción de los cuerpos celulares (Ooigawa et al., 2006), como vemos en detalle en el córtex (Fig. 23C) de los ratones WT tratados crónicamente con etanol. Sin embargo, no detectamos cambios significativos entre los ratones TLR4-KO tratados y no tratados, para ninguna de las dos tinciones realizadas (Fig. 23 A-D).

A TINCIÓN LUXOL FAST BLUE

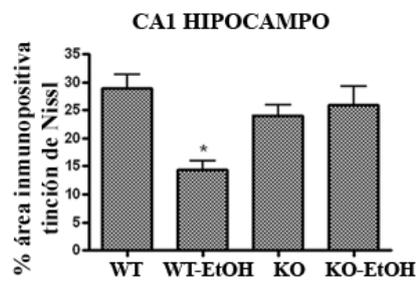
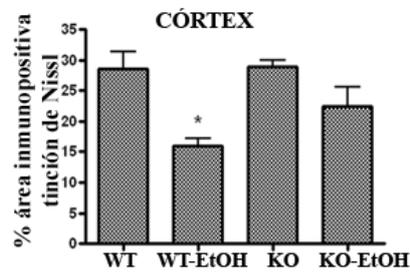


B





D



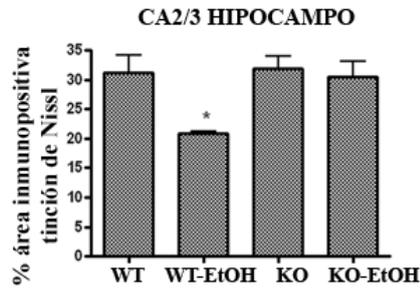


Figure 23: El alcohol induce alteraciones en la mielina y daño neuronal. A, B: La tinción de Luxol Fast Blue (LFB) (A) muestra una significativa reducción de la mielina en el cuerpo calloso (CC) de los ratones crónicos WT. C, D: La tinción de Nissl (C) realizada en ratones con tratamiento crónico de etanol y no tratados, WT y TLR4-KO, demuestra que existe una notable reducción en el número de neuronas de la corteza, al igual que en las subregiones CA1 y CA2/3 del hipocampo, de los ratones crónicos WT, comparando con sus controles. En ninguna de las dos tinciones se observaron cambios significativos entre los ratones TLR4-KO tratados/no tratados (C, D). Escala: 200 μm . Ampliaciones: 20 μm (corteza y CA1) y 10 μm (CA2/3). Escala: 200 μm , con detalles, 50 μm . Los valores representan la [media \pm S.E.M.] $n=3$ experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Las neuronas oscuras, conocidas como “*deep-blue neuron*” han sido descritas en diversas condiciones patológicas, como son la epilepsia, la isquemia cerebral, etc. entre otras enfermedades (Lee et al., 2004) donde se indica que el daño neuronal producido es irreversible.

Estos resultados, indican que el tratamiento crónico de alcohol induce desmielinización y pérdida neuronal en el córtex y otras regiones del cerebro afectadas por un abuso de alcohol, y asimismo, sugieren que la señalización de TLR4 participa en estas alteraciones.

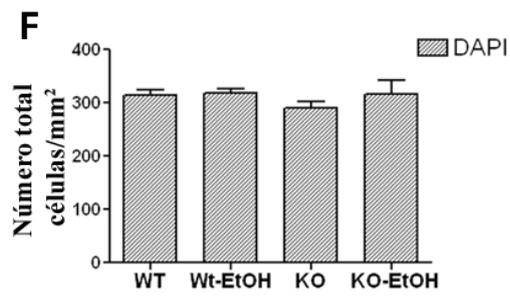
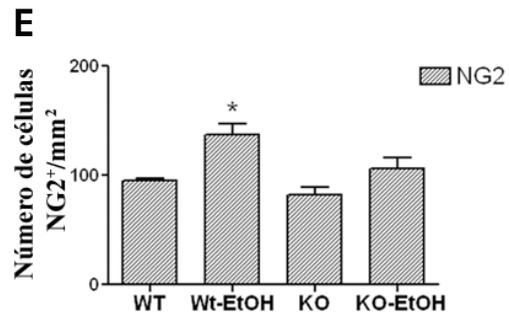
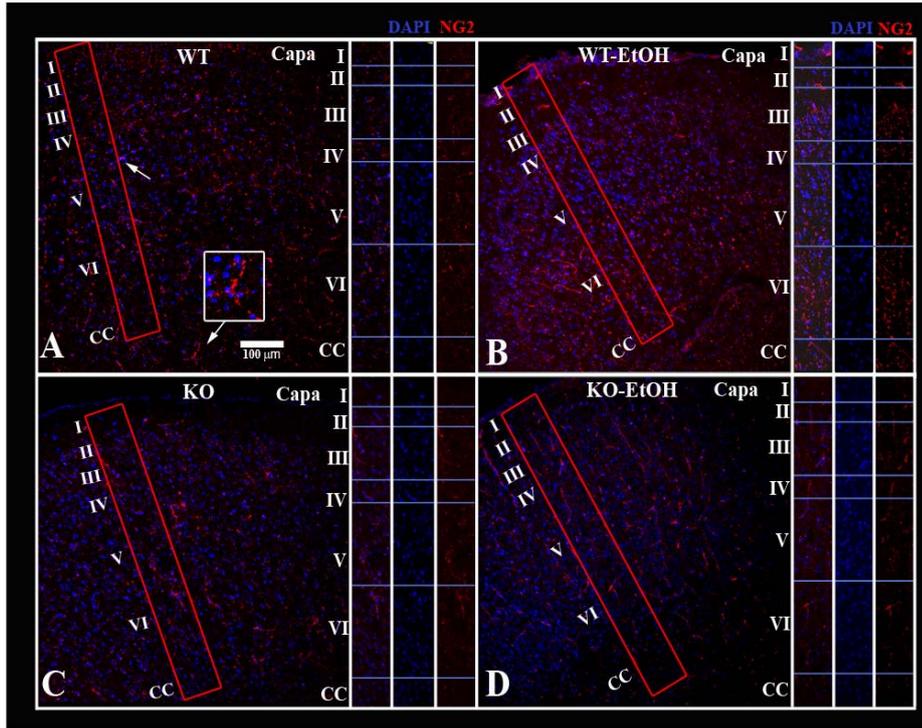
4.3.3. El consumo crónico de alcohol induce la muerte de los oligodendrocitos y aumenta las células NG2+: implicación del receptor TLR4.

Con el fin de obtener más información, acerca de si un incremento en las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) NG2 positivas (Kang et al., 2010), podría correlacionarse con una pérdida de oligodendrocitos, se midió el número de células NG2 positivas en las diferentes capas corticales de la corteza prefrontal (PFC) y se determinó la proporción de oligodendrocitos que colocalizaran con caspasa-3. El índice de células NG2 positivas para cada una de las capas corticales se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$I = [(\text{Número OPCs NG2 positivas} / \text{Número total células}) / \text{Número de la capa cortical (I-VI)}].$$

La figura 15, muestra como el tratamiento crónico de etanol aumentó el número de células NG2 positivas en las distintas capas corticales de los ratones WT crónicos (Fig. 15 B, G), además observamos que el aumento en el número de células NG2 positivas, era estadísticamente más significativo en las capas corticales más internas (IV-VI) que en las más externas (II-III) (Fig. 24G).

No observamos cambios significativos importantes, en el caso de los ratones TLR4-KO tratados y no tratados con etanol prolongadamente (Fig. 24C, D, G). La cuantificación del número total de células NG2 positivas en todas las capas corticales (Fig. 24E) con respecto al número total de células (Fig. 24F) evidencia un incremento significativo en el número de células NG2 positivas en los ratones WT crónicos en relación a sus controles. No se encontraron diferencias significativas entre los ratones TLR4-KO tratados con etanol o no tratados.



G

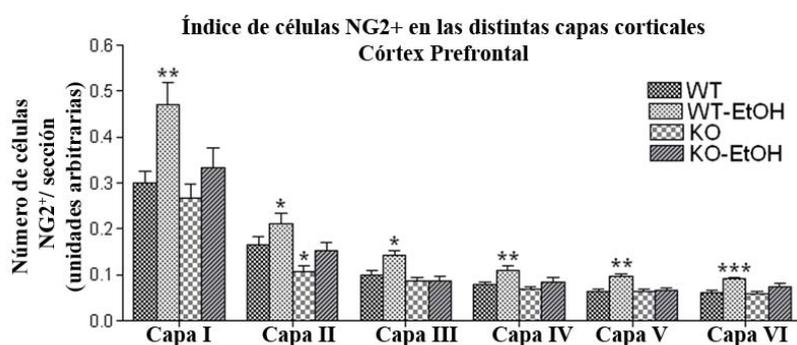
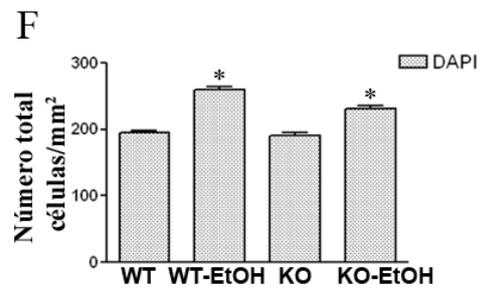
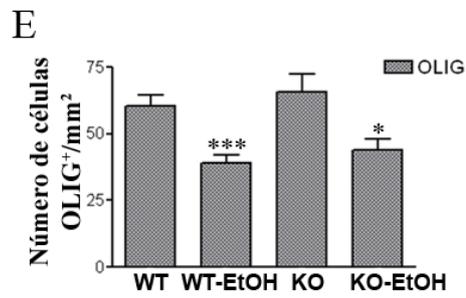
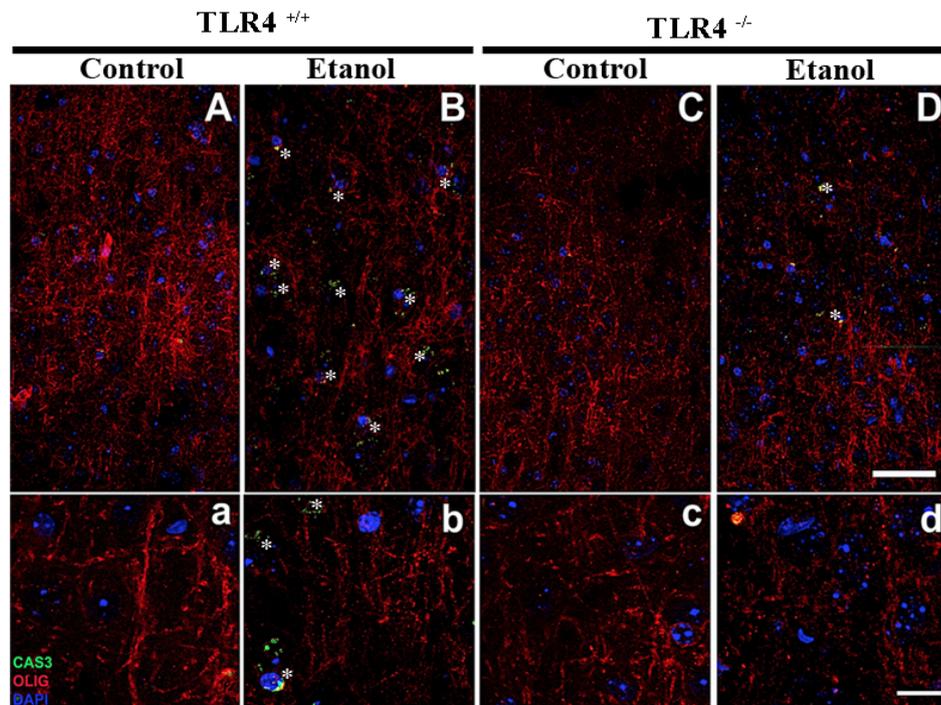


Figure 24: Alteraciones de NG2 en el córtex prefrontal por abuso de alcohol. Las imágenes de confocal de las diferentes capas corticales del área PFC (I-VI) revelan que los ratones WT (A, B) y los TLR4-KO (C, D) presentan una distribución distinta de las células NG2⁺. Las flechas indican la tinción positiva, véase ampliación detallada. Observamos, un incremento en el número de células NG2⁺ en los ratones WT tratados con etanol (B, E) respecto a sus controles (A, E). No observamos diferencias en los ratones TLR4-KO (C, D, E) (Escala: 100µm). Número total de células NG2⁺ (E) y número total de células (F). Se calculó un índice representativo del número de células NG2⁺ en cada capa cortical (G) tomando 3-7 áreas al azar de 100 µm² /capa cortical. Los valores representan la [media±S.E.M.]. n = 3 experimentos independientes *p<0.05; **p<0.01; *** p<0.001 (test no paramétrico de la U Mann Whitney testando la normalidad con test de la Z Kolmogorov- Smirnov o Prueba t-student).

Por otro lado, mediante una inmunohistoquímica de doble marcaje, donde vemos OLIG (marcador de oligodendrocitos) y caspasa-3 (CA-3), observamos que el tratamiento crónico de etanol incrementó notablemente el número de oligodendrocitos marcados positivamente con CA-3 (Fig. 25B, H), dando lugar a una reducción en el número de oligodendrocitos en el área PFC de los ratones WT (Fig. 16B, E). Sin embargo, en los ratones TLR4-KO con tratamiento crónico de etanol, vimos que el número de células OLIG⁺ disminuía ligeramente (Fig. 25D, E), pero esta reducción no iba acompañada ni por un incremento en el número de oligodendrocitos marcados con CA-3 (Fig. 25H) ni por la activación de la CA-3 (Fig. 25G). Además, observamos que el número total de células en el área de PFC estaba incrementado significativamente en los ratones WT crónicos (Fig. 25F), un evento que puede ser debido a la proliferación de células gliales y procesos de gliosis reactiva (Alfonso-Loeches et al., 2010) y/o por la presencia de macrófagos e infiltrados. También, observamos que el etanol aumentó el número de células en la PFC de los ratones TLR4-KO (Fig. 25F). Estos resultados, apoyan el hecho de que

el tratamiento crónico de etanol no sólo causa alteraciones en la mielina, sino que también produce la muerte de oligodendrocitos, a pesar del aumento de células NG2 positivas, las cuáles tratarían de compensar esos déficits.



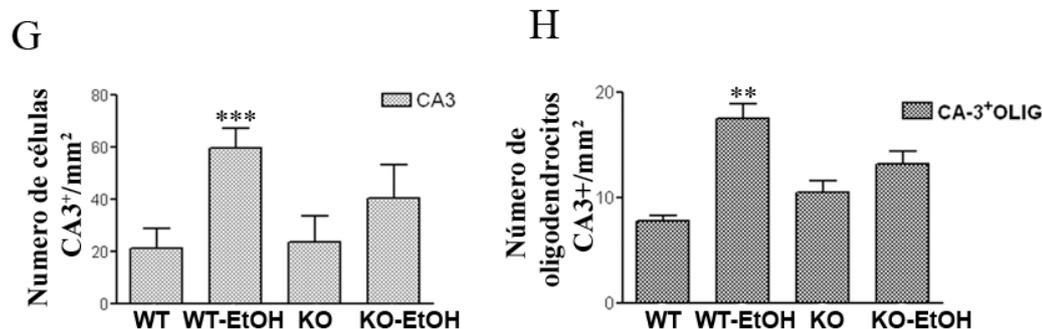


Figure 25: Muerte de oligodendrocitos por consumo crónico de alcohol en corteza. Inmunofluorescencia de doble marcaje con caspasa-3 (CA-3) y oligodendrocitos (OLIG) (asteriscos) de ratones tratados o no tratados con alcohol, WT (A, B) y TLR4-KO (C, D). El etanol reduce el número de células OLIG⁺ (E), e incrementa el número de oligodendrocitos-CA-3⁺ (B, H), comparando con sus controles (A, H) en los ratones WT. La reducción en las células OLIG⁺ (E) al igual que una tendencia en los oligodendrocitos marcados CA-3⁺ también se observó en los ratones TLR4-KO crónicos (D, H). El número total de células (F) y el número total de CA-3⁺ (G) es representado. Escala: 50 μ m (A-D), con detalles: 20 μ m (a-d). El análisis cuantitativo se realizó contando de 100-500 células como mínimo de 5 cortes coronales del cerebro/animal. n= 3 animales/grupo. Los datos muestran la [media \pm S.D.] * p < 0.05, **p < 0.01, *** p < 0.001 (Prueba t-student).

4.3.4. Cambios ultraestructurales y desestructuración de la mielina causados por consumo crónico de alcohol.

Recientes evidencias en técnicas de neuroimagen, indican que el abuso de alcohol altera la estructura de la materia blanca y las fibras de mielina en el cuerpo calloso (CC) y en el córtex (CTX) (Pfefferbaum et al., 2006b; Pfefferbaum et al., 2010). Por tanto, con el fin de investigar las alteraciones en las fibras de mielina inducidas por un abuso de alcohol, se analizaron mediante el uso de microscopía electrónica, la estructura de las fibras de mielina en el CTX y en el CC de ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO tratados con o sin alcohol.

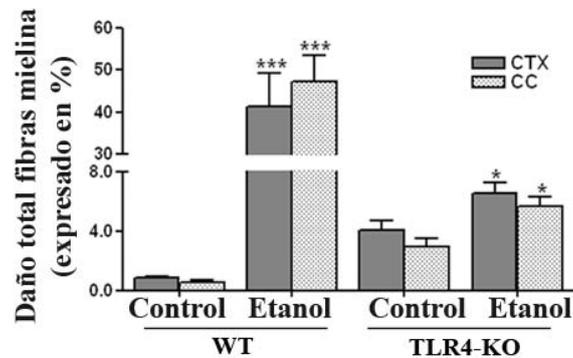
La Figura 26 (A, B, I) muestran imágenes representativas en donde se ilustra las fibras de mielina y su estructuración en capas concéntricas formando una membrana que rodean de forma espiral a los axones del CC y del CTX de animales WT. En la figura, también se muestran las notables alteraciones en la disposición compacta de las fibras de mielina en ratones WT tratados con alcohol. De hecho, se

observó que el 47.3% y 41.2 % de los axones de los ratones tratados con alcohol, mostraban alteraciones morfológicas en la estructura de las fibras de mielina del CC y del CTX, respectivamente (Fig. 26C, D, J, flechas). Además, observamos ciertas vesículas que parecía contener debris celular (asterisco) (Fig. 26C, D), sugiriendo una acumulación de vesículas cargadas de restos y orgánulos defectuosos, y esto quizás podría indicarnos defectos en los mecanismos de degradación.

La Figura 26 (G, H) también muestra que el consumo de alcohol causa pequeñas modificaciones de la mielina en CC y CTX de animales TLR4-KO tratados, conocidos como daño focal (ver puntas de flecha en Fig. 26 (G, H, L), pero estas modificaciones no parecen alterar la integridad de la mielina.

Las barras de la Figura 26, representan el porcentaje del daño total de las fibras de mielina en los diferentes grupos de estudio. Los resultados mostrados, indican un incremento significativo en el daño total de las fibras de mielina en CC y CTX de ratones WT tratados con etanol. Sin embargo, en los ratones TLR4-KO tratados con etanol, sólo el 6.6 % y 5.7% del total de las fibras de mielina de CTX y CC respectivamente, mostraron ciertas alteraciones (Fig. 26).

Estos resultados sugieren que la deficiencia en el receptor TLR4 confiere cierta neuroprotección, ya que se observa daño focal, ante los efectos deletéreos del etanol.



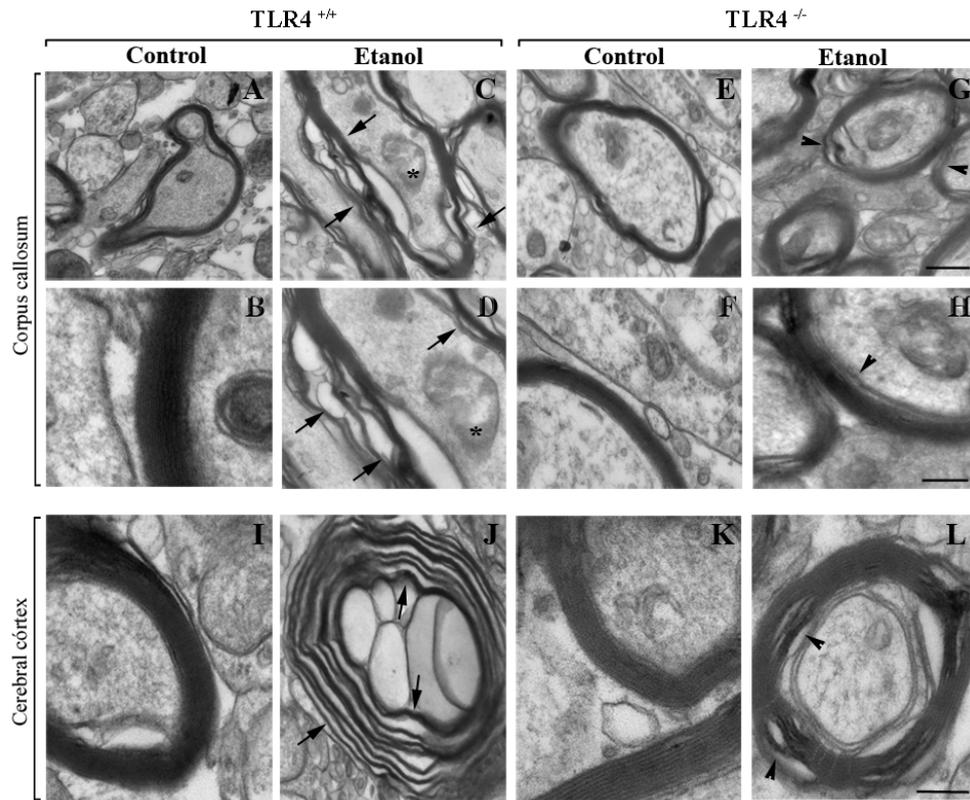


Figure 26: Daño en las fibras de mielina por tratamiento crónico de etanol. El análisis de microscopía electrónica muestra alteraciones de la mielina en el cuerpo calloso y en el córtex de los ratones tratados crónicamente con etanol WT y TLR4-KO. Vemos microfotografías representativas del microscopio electrónico de transmisión en el cuerpo calloso (A-H) y en el córtex (I-L) obtenida de cortes ultrafinos de tejido de ratones WT y TLR4-KO tratados y no tratados con etanol durante 5 meses. Una microfotografía representativa de 3 experimentos independientes es mostrada. Las barras representan los valores en porcentaje de cuantificación del daño total en las fibras de mielina (%) en el cuerpo calloso y en el córtex. Escala representa: A, C, E, G, 500 nm; B, D, F, H, 100 nm en el cuerpo calloso y para I-L, 200 nm en el córtex cerebral. El daño focal en las fibras de mielina es mostrado (puntas de flecha), y el daño en la fibra total (flechas). Un asterisco muestra una posible vacuola con debris celular en su interior. Los datos representan la [media± S.E.M]. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. (Prueba t-student).

4.4. DETECCIÓN DE ALTERACIONES CEREBRALES INDUCIDAS POR EL CONSUMO DE ALCOHOL MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UN SISTEMA DE IMAGEN *IN VIVO*.

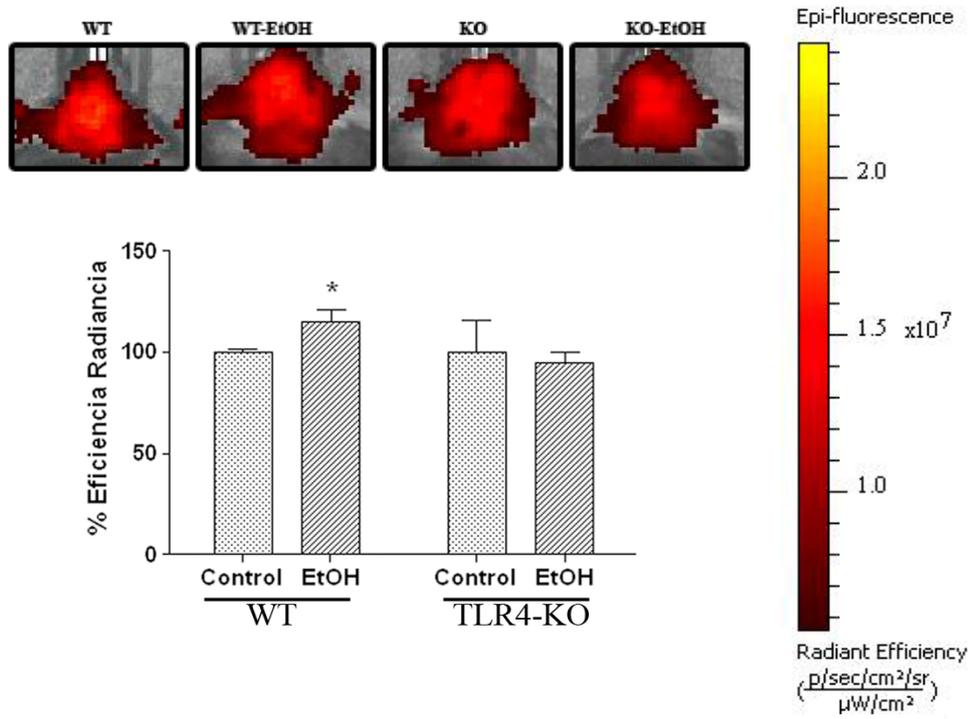
Para confirmar el papel de TLR4 en los procesos de neuroinflamatorios inducidos por el alcohol así como evaluar la pérdida de mielina y alteraciones neuronal, etc., se utilizó un sistema de imagen *in vivo* llamado IVIs 200. Este sistema óptico de imagen avanzado permite captar imágenes bidimensionales e incluso tridimensionales con un marcaje específico para diferentes proteínas marcadoras de glía o neuronas. Además, esta técnica no invasiva, permite seguir un proceso en el mismo animal durante un tiempo determinado, que dependerá de la proteína de estudio y/o del tratamiento aplicado.

4.4.1. Papel del receptor TLR4 en la inflamación producida por consumo crónico de alcohol a nivel cerebral y peritoneal.

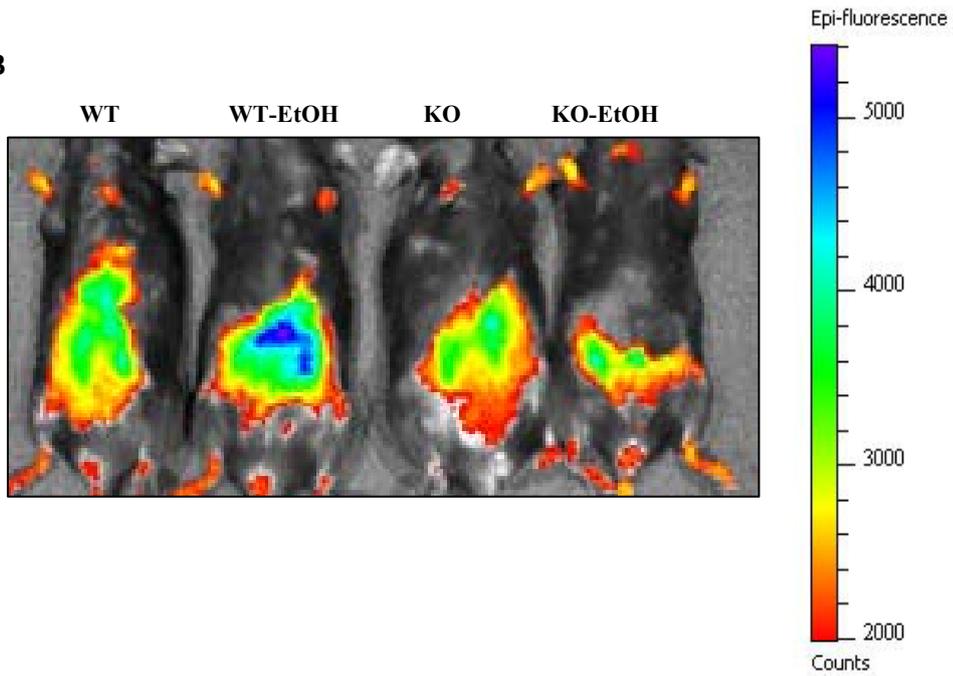
La inflamación en el cerebro se asocia con la activación del sistema inmune innato, como respuesta a una infección o daño y se manifiesta por activación de las células gliales, y en ciertos casos, muerte neural.

Para determinar si el consumo de alcohol activaba, no sólo al sistema inmune del cerebro, sino que también estimulaba a las células del sistema inmunitario del ratón, como los macrófagos, neutrófilos, monocitos, etc. se administró a los animales una sonda denominada “Rediject” (Caliper LifeSciences) a ratones WT y TLR4-KO tratados con o sin etanol durante 5 meses. RediJect es una sonda quimioluminiscente capaz de detectar la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) en los fagocitos activos, y permite determinar los niveles de activación de MPO y el estado de inflamación que presenta del animal *in vivo*, en una amplia variedad de modelos de enfermedades como pueden ser el shock séptico agudo, cánceres ricos en neutrófilos, artritis reumatoide, etc. todos con un denominador común, que es la inflamación. Esta sonda, se administró a los animales a una concentración de 200mg/kg, los animales se monitorizaron en el IVIs y la intensidad de la sonda se cuantificó por el programa de imagen específico de la misma casa comercial.

A



B



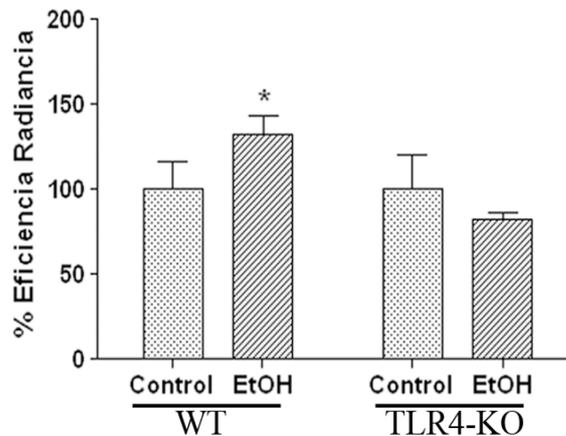


Figura 27: Inflamación cerebral producida por abuso de alcohol. Observamos el marcaje de la inflamación in vivo mediante el uso de la sonda fluorescente Rediject en el cerebro (A) y la zona peritoneal (B) en ratones WT y TLR4-KO tratados y no tratados con etanol durante 5 meses. Tras 24 h post-inyección, se observa un incremento significativo en la intensidad de la sonda tanto en el cerebro como en el peritoneo (posiblemente debido a la activación de los macrófagos peritoneales) de ratones WT. No se observaron cambios significativos en la intensidad de la sonda en los ratones TLR4-KO tratados/no tratados con etanol. Las barras, representan los valores de cuantificación de la sonda expresados en % de la eficiencia radiante. Los datos representan la [media ± S.E.M.] (n = 3-4). * $p < 0.05$

Los resultados de la Figura 27, muestran como el consumo crónico de alcohol incrementa la intensidad de la señal de la sonda Rediject tanto en cerebro como en el peritoneo de ratones WT tratados crónicamente con alcohol, mientras que el mismo tratamiento no causó cambios en la intensidad de la señal de la sonda ni en el cerebro ni en el peritoneo de los ratones TLR4-KO (Fig. 27 A-B).

4.4.2. Activación glial y muerte neuronal en el cerebro de animales con consumo crónico de alcohol.

Numerosos estudios han demostrado que durante la neuroinflamación se produce una activación de la glía, que se asocia normalmente con patologías de origen neurodegenerativo (Przedborski and Vila, 2003). De hecho, las células gliales, especialmente los astrocitos, poseen una función como soporte estructural y

en el metabolismo, manteniendo la homeostasis y correcta función del sistema nervioso. Sin embargo, una activación excesiva de la microglía y de la astrogliosis reactiva puede desencadenar un proceso inflamatorio que pueden conllevar a muerte neuronal.

Nuestros resultados anteriores demostraban que el consumo crónico de alcohol causa gliosis y muerte neuronal.

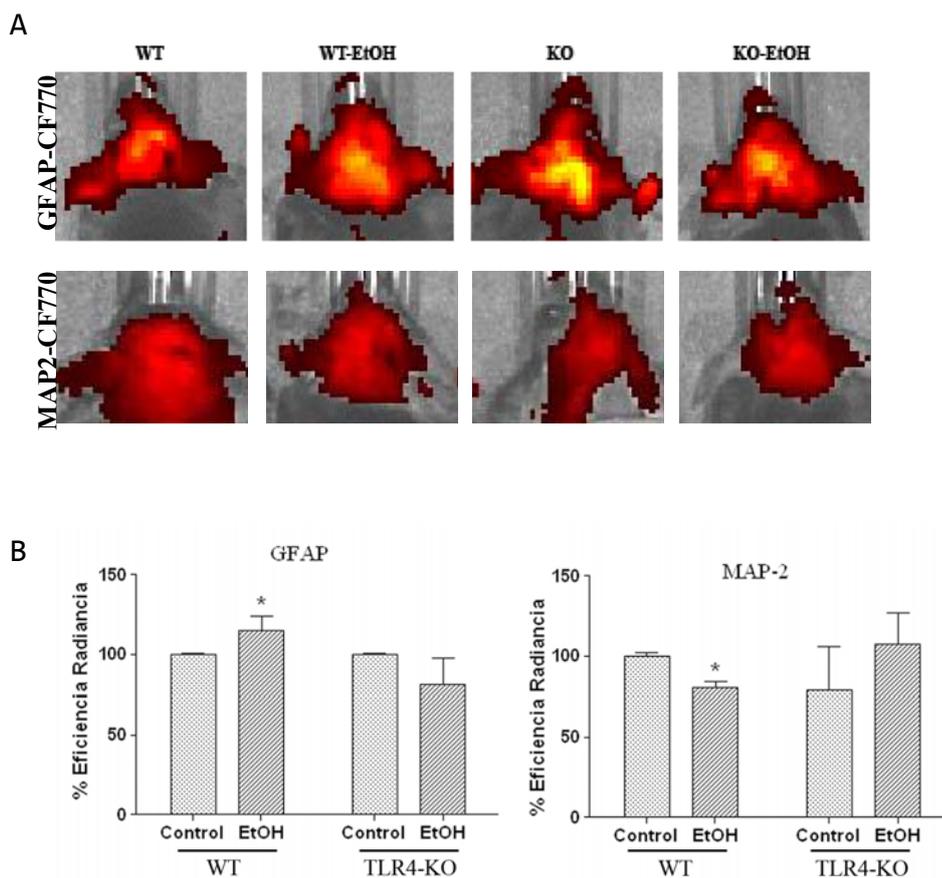


Figura 28: Cambios en astrogliosis y neuronales en ratones WT y TLR4-KO tratados con o sin alcohol durante 5 meses. A los animales se les administró (IP) sondas fluorescentes, GFAP-CF770 y MAP2-CF770. Tras 24 horas de la administración se capturaron las imágenes (A). Observamos la cuantificación en porcentaje de la eficiencia de la radiancia (B), donde los datos se presentan como la [media \pm S.E.M.] (n = 4-5). * p < 0.05

Mediante el uso de sondas apropiadas para poder detectar astrogliosis (GFAP-CF770) y neuronas (MAP2-CF770), quisimos comprobar si podíamos evaluar cambios astrogliales y neuronales en animales WT y TLR4-KO tratados y no tratados con etanol utilizando el aparato de imagen *in vivo*, IVIs 200.

Nuestros resultados, muestran una reducción significativa en la intensidad de fluorescencia de la sonda MAP2-CF770 (Fig. 28A,), efecto que se correlaciona con un aumento significativo en la intensidad el aumento de GFAP (GFAP-CF770) en los cerebros de los ratones WT tratados con alcohol crónicamente (Fig. 28B), mientras que no se produjeron cambios significativos en el caso de los ratones TLR4-KO tratados y no tratados.

4.4.3. Cambios en la proteína proteolipídica (PLP) tras el consumo crónico de alcohol.

Nuestros resultados anteriores, demostraban que el consumo prolongado de alcohol causa desmielinización y altera la estructura de las vainas de mielina. Mediante el uso del IVIS quisimos evaluar si este sistema nos permitía examinar cambios en las proteínas de la mielina en el animal *in vivo*. En nuestro caso, utilizamos la proteína proteolipídica (PLP), proteína mayoritaria de la mielina en cerebro.

Para ello, administramos una sonda fluorescente unida a la PLP (PLP-CF770) a ratones WT y TLR4-KO tratados con o sin etanol. Nuestros resultados, muestran una significativa reducción en la intensidad de fluorescencia de la sonda PLP-CF770 en los cerebros de los ratones WT tratados con alcohol crónicamente (Fig. 29A), mientras que no se produjeron cambios significativos en el caso de los ratones TLR4-KO tratados y no tratados.

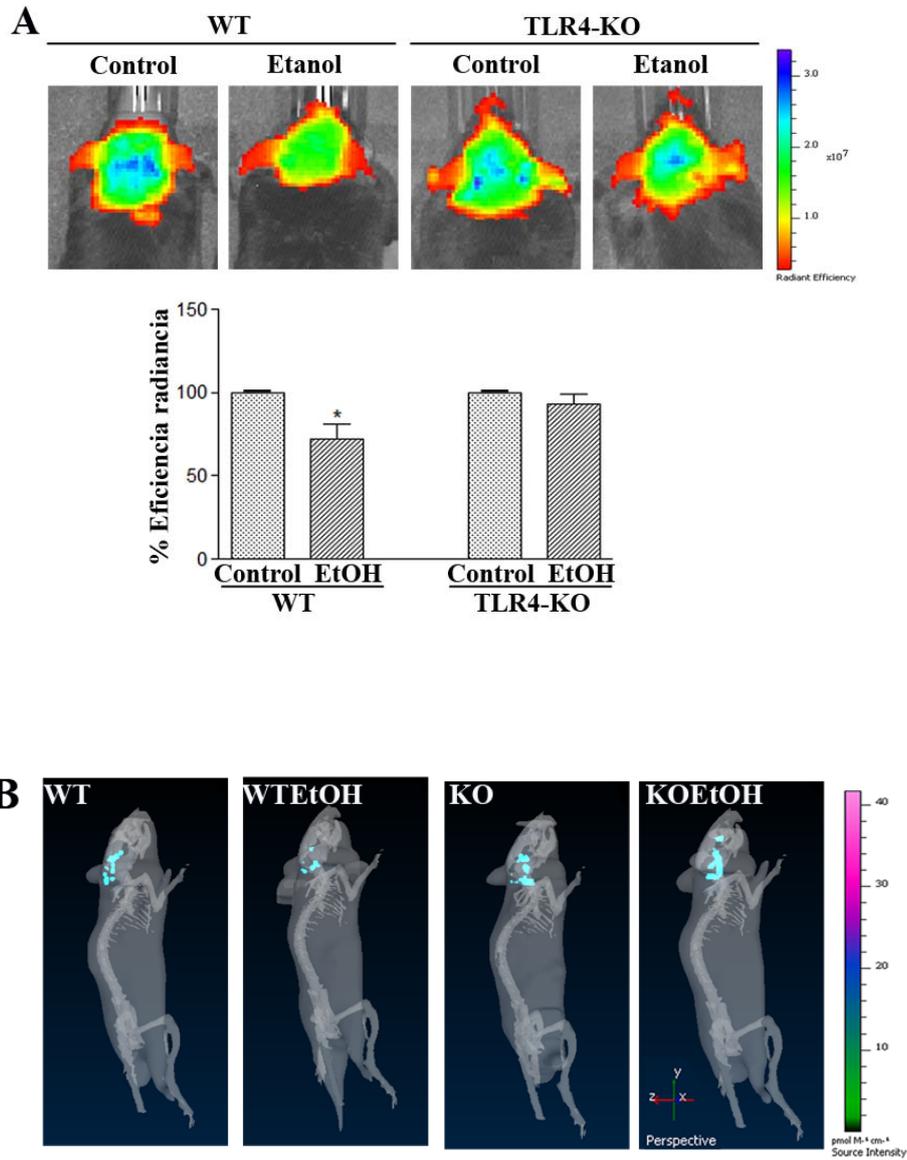


Figure 29: Expresión de PLP in vivo en ratones tratados con o sin alcohol. Vemos la expresión de PLP fluorescente en el cerebro de los animales vivos, tanto de WT como TLR4-KO tratados y no tratados con alcohol durante 5 meses. A: Las imágenes cerebrales representan la sonda fluorescente unida a PLP (PLP-CF770), tras 72 h de la inyección. Las barras, representan los valores de cuantificación de la sonda PLP-CF770, expresándose en % de la eficiencia radiante. Los datos representan la [media ± S.E.M.] (n = 4). * p < 0.05. B: Imágenes longitudinales de la distribución de la sonda fluorescente PLP-CF770 en los cerebros de los ratones, mediante una reconstrucción in vivo tridimensional (3D).

Otra de las opciones de este aparato de imagen, nos permitió emplear la tomografía fluorescente (FLIT) para obtener una reconstrucción tridimensional (3D) *in vivo* de la distribución fluorescente de PLP en el cerebro (Fig. 29B). La sonda específica confirmó que PLP sólo se detectaba en cerebro; sin embargo, resultó difícil establecer que regiones estaban afectadas por el consumo crónico de alcohol. En resumen, las observaciones que se recogen de este estudio de imagen, confirmaron los resultados obtenidos en la Figura 20, demostrando que el tratamiento crónico de alcohol reduce significativamente los niveles de PLP en distintas regiones cerebrales, y apoya la idea de que la eliminación del receptor TLR4 protege de algún modo contra la disminución drástica de esta proteína en el cerebro debida a un abuso de alcohol.

4.5 LA RESPUESTA DE TLR4 AL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL SE ASOCIA CON CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN EL CEREBRO.

Las modificaciones covalentes post-traduccionales que afectan a las histonas, pueden ser debidas a procesos de metilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, y acetilación. Estas modificaciones están reguladas por enzimas, como es el caso de las acetilaciones donde participan las histonas acetil-transferasas (HAT), cuya función es la de acetilar residuos conservados de lisina en las histonas, y las histonas-deacilasas que elimina los grupos acetilo.

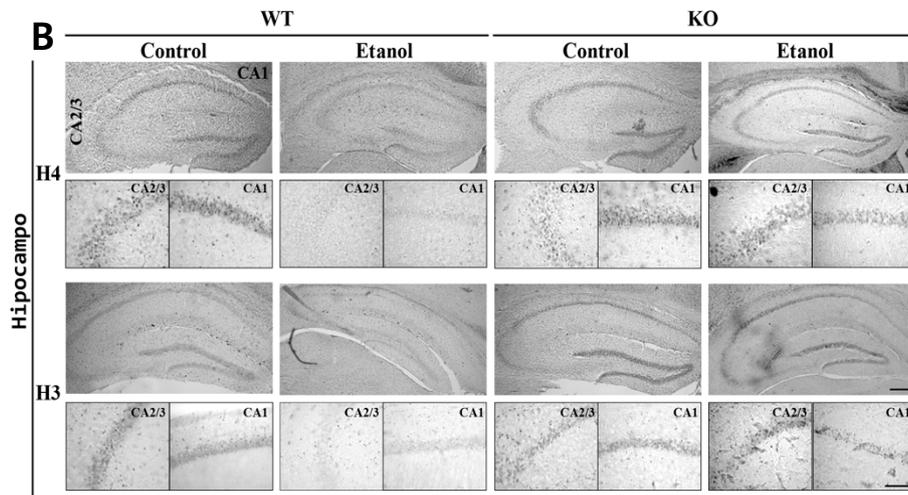
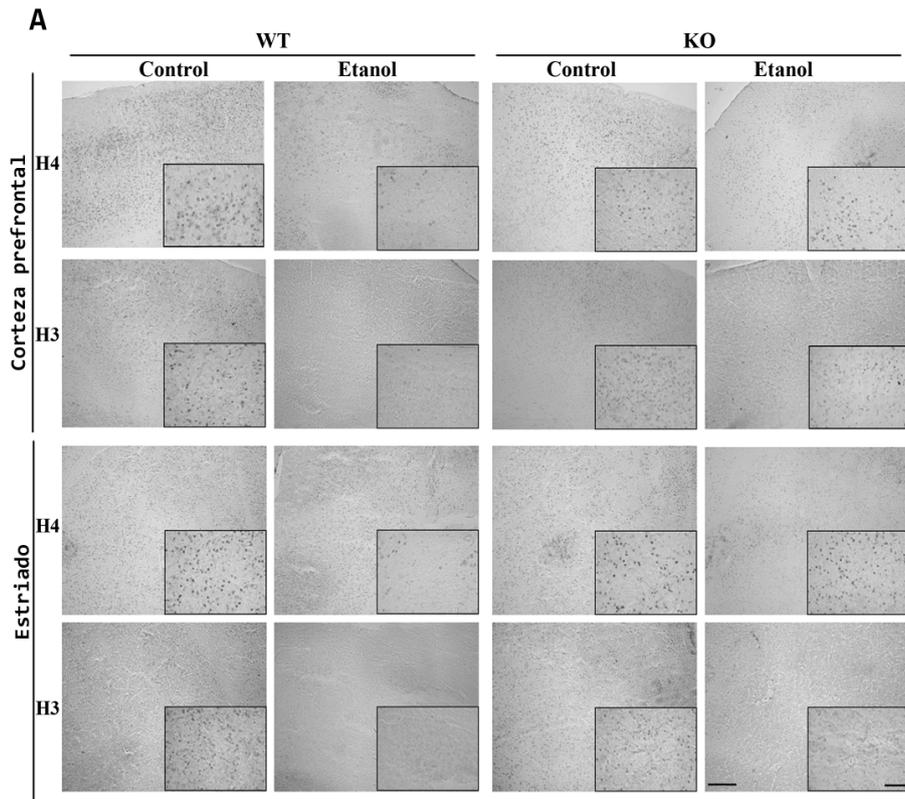
4.5.1. El consumo de alcohol altera la acetilación de histonas en el cerebro. Papel de los receptores TLR4.

La acetilación de histonas, es un proceso importante que controla la expresión génica y que participa en los procesos de aprendizaje y memoria, los cuales se ven afectados en muchas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (Graff and Mansuy, 2009; Graff et al., 2012). Al mismo tiempo, la adicción incluyendo la del alcohol, se asocia con cambios epigenéticos y en la acetilación de histonas (Pascual et al., 2012).

Con el fin de obtener una mayor información acerca de los efectos cognitivos y conductuales del consumo crónico de alcohol, se realizaron pruebas para evaluar cambios cognitivos en los ratones TLR4^{+/+} (WT) y TLR4-KO tratados con o sin etanol. Asimismo, en estos mismos animales se evaluó la acetilación de histonas y la actividad de las HAT. Los resultados, mostraron que el consumo de alcohol altera los procesos de memoria e induce ansiedad en animales TLR4^{+/+} tras 15 días de privación de alcohol (Pascual et al., 2011). Estos efectos conductuales no se observaron en ratones TLR4-KO tratados con etanol, en concordancia con la disminución de la neuroinflamación en ratones deficientes en los receptores TLR4. Estos cambios, se asociaron a una disminución significativa en las acetilaciones de la H4 (acetil-histona 4) en el córtex prefrontal [H4: $F(3, 8) = 4.86$, $p < 0.05$; H3: $F(3, 8) = 0.73$, $p > 0.05$] y en el hipocampo [H4: $F(3, 8) = 4.25$, $p < 0.05$ para CA1 y CA2/3; H3: $F(3, 8) = 1.11$, $p > 0.05$ para CA1 y CA2/3] (Fig. 30A).

Al mismo tiempo, se produjo una reducción de las histonas H3 y H4, en el estriado [H4: $F(3, 8) = 11.00$, $p < 0.01$; H3: $F(3, 8) = 11.74$, $p < 0.01$] (Fig. 10B) de los ratones silvestres tratados con alcohol crónicamente. No se observaron cambios significativos en la inmunoreactividad de las acetilaciones de H3 y H4 en las áreas estudiadas en los ratones TLR4-KO (Fig. 30).

Estos resultados sugieren el posible papel del receptor TLR4 en las modificaciones epigenéticas y en las consecuencias cognitivas asociadas con la neuroinflamación que induce el consumo y abuso de alcohol.



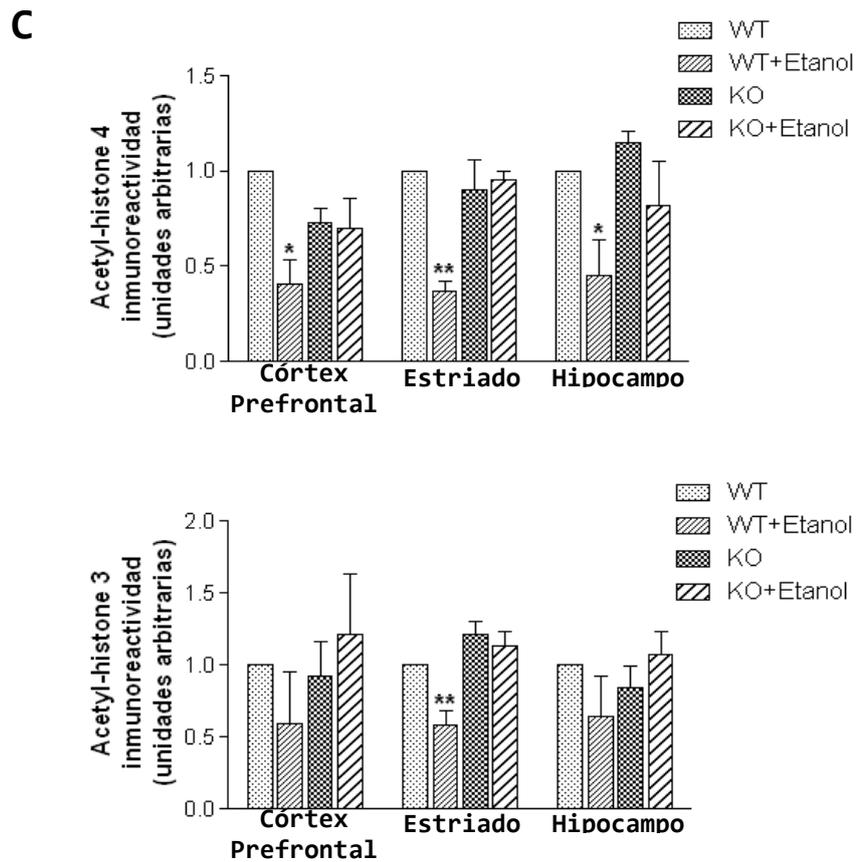


Figure 30: Papel del TLR4 en la acetilación de histonas tras un consumo crónico de etanol. Las imágenes representan la inmunohistoquímica de la histona H4 y de la H3 en el cortex prefrontal (A), estriado(A) e hipocampo (B) de los ratones $TLR4^{+/+}$ (WT) y $TLR4$ -KO tratados/no tratados crónicamente con etanol (escala; 300 μ m (hipocampo), 120 μ m (resto) y detalles a 60 μ m). Las barras representan (C) la cuantificación de la inmunoreactividad de las acetilaciones de H3 y H4, [media \pm S.E.M] (n = 4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ mediante ANOVA de una vía seguido por una Prueba de Newman Keuls's post-hoc.

5. DISCUSIÓN

5.1. PAPEL DEL RECEPTOR TLR4 EN EL DAÑO NEURAL Y NEUROINFLAMACIÓN PRODUCIDOS POR EL ALCOHOL.

5.1.1. Papel de TLR4 en los efectos neuroinflamatorios que induce el alcohol.

El cerebro es una de las dianas principales en las acciones del etanol. El abuso de alcohol puede causar daño cerebral, disfunciones neurológicas y cognitivas y en algunos casos, neurodegeneración (Crews and Nixon, 2009), incluso en ausencia de otras complicaciones, como la hepatopatía alcohólica (Harper and Matsumoto, 2005). De hecho, el alcohol es un tóxico para las células neurales (Pascual and Guerri, 2007), y su abuso puede causar en humanos la muerte neural y reducción en la masa cerebral (de la Monte, 1988). Otros estudios, muestran en animales experimentales, que la administración de alcohol de forma concentrada y (termino anglosajón, *binge drinking*) causa neurodegeneración (Crews et al., 2004). Sin embargo, actualmente, los mecanismos que subyacen al daño cerebral inducido por el alcohol se desconocen.

Resultados anteriores de nuestro laboratorio, habían demostrado que el consumo crónico de alcohol producía un aumento de mediadores inflamatorios y citoquinas en el cerebro de ratas, además de una activación de las vías de transducción intracelulares asociadas a la activación de los receptores IL-1RI/TLR4 (Valles et al., 2004). En base a estos resultados, se propuso que el etanol podría causar daño cerebral mediando mecanismos de neuroinflamación (Blanco and Guerri, 2007).

Una característica importante que contribuye a los procesos de inflamación y neurodegeneración, es la activación de los TLRs y de las células gliales, ya que desencadenan la producción de citoquinas, compuestos proinflamatorios y tóxicos, que causan daño cerebral (Kielian, 2006; Farina et al., 2007; Tang et al., 2007; Okun et al., 2009). Estudios recientes, sugieren que la activación de los receptores TLRs (*Toll-like receptors*) en las células gliales, microglía y astrocitos (Kielian, 2006; Carpentier et al., 2008) desempeña un papel relevante en la respuesta inmune del SNC, tanto en la defensa contra patógenos como contra el daño neural, pero una respuesta exacerbada puede causar patología.

Nuestros resultados previos, sugerían que el alcohol, a través de la activación de receptores TLR4 e IL-1RI en células astrogliales estimulaba las vías de señalización intracelular (IKK, MAPKs) y factores de transcripción (NF- κ B, AP-1) que conllevaban a la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios (iNOS, NO, COX-2) (Blanco et al., 2005; Blanco et al., 2008). Los resultados del presente trabajo, demuestran que el receptor TLR4 posee un papel crítico y esencial en la neuroinflamación que induce el etanol en la astroglia, ya que cuando bloqueamos su expresión o función, mediante el uso de siRNA o de células gliales de ratones deficientes para el receptor TLR4, se suprime gran parte de los efectos inflamatorios que causa el etanol, como la activación de la cascada inflamatoria MAPKs/NF κ B ó la inducción de mediadores inflamatorios en células astrogliales en cultivo.

Las astroglia, juega un papel importante en los procesos de reparación y cicatrización tras un daño en el cerebro o en la espina dorsal (Farina et al., 2007). Frente a un daño, la astroglia responde aumentando su proliferación y causando una hipertrofia de la célula, a veces en forma de gemistocitos, y que suele terminar con la producción de fibras gliales. Estas fibras pueden constituir una cicatriz glial, que representa una forma de reparación propia del tejido nervioso en respuesta a una inflamación. De hecho, la astrogliosis hipertrófica reactiva se considera un marcador de neuroinflamación, del mismo modo que suele asociarse con enfermedades neurodegenerativas (Heneka et al., 2005; Vanzani et al., 2005; Rodriguez et al., 2009).

De acuerdo con los hallazgos obtenidos en cultivo primario de astrocitos, nuestros resultados *in vivo* demuestran que el consumo crónico de alcohol causa una activación de la astroglia e incluso desencadena procesos de astrogliosis en la corteza cerebral. Un aumento en la inmunoreactividad de la GFAP (GFAP-IR) junto con la presencia de astrocitos hipertróficos, son eventos que comúnmente se asocian a un daño en el SNC (Wilhelmsson et al., 2006; Chvatal et al., 2007; Barcia et al., 2009). Además, observamos que el tratamiento con alcohol también activa a la microglía, tal y como demostramos por la presencia de microglía reactiva. De hecho, las células microgliales se consideran los macrófagos residentes del cerebro, capaces de activarse cuando hay un daño, estrés o infecciones. Estas células expresan múltiples TLRs (Block et al., 2007). Datos de nuestro laboratorio indican, que el

etanol es capaz de activar a la microglía en cultivo, alterando su estado morfológico de inactivo (forma arbustiva) a activo (forma fusiforme/ameboidea), lo que desencadena vías de señalización y liberación de mediadores inflamatorios asociados con la activación de los receptores TLR4 (Fernandez-Lizarbe et al., 2009).

Asimismo, al igual que los resultados obtenidos *in vitro* en cultivos de astrogliá y microglía, demostramos por primera vez *in vivo* que la eliminación en la función de los receptores TLR4, reduce significativamente la hipertrofia astrocítica y se suprime totalmente la activación microglial que causa el tratamiento crónico de alcohol. Estos resultados sugieren que la activación de los receptores TLR4, desempeña un papel crucial en la hipertrofia glial. Sin embargo hay que destacar, que en ratones TLR4-KO no se elimina totalmente la astrogliosis. Este efecto, creemos que es debido a que el alcohol activa al receptor tipo I de la interleuquina-1, IL-1RI en astrocitos (Blanco and Guerri, 2007; Blanco et al., 2008) pero no en microglía, ya que no expresa este tipo de receptores, causando una leve astrogliosis en la corteza cerebral de ratones TLR4-KO.

La activación de las células gliales, es un proceso crítico en los procesos de neuroinflamación (Streit et al., 2004; Block et al., 2007), y junto a los datos que hemos obtenido, demuestran claramente que la activación glial inducida por el etanol se asocia con la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6) y de mediadores inflamatorios como iNOS y COX-2 en la corteza cerebral de ratones TLR4^{+/+} tratados crónicamente con etanol. Además, demostramos el papel del TLR4 en estos procesos, ya que la eliminación de estos receptores previene tanto de la activación glial como de su respuesta inflamatoria, y del aumento en la liberación de citoquinas y compuestos inflamatorios.

Es importante resaltar, que la activación de la microglía junto con la producción de citoquinas, también se ha descrito tras un periodo corto de tratamiento del etanol, como tras 10 días de tratamiento (Qin et al., 2008) o tras una administración aguda (Fernandez-Lizarbe et al., 2009). Además, en estudios postmortem de cerebros alcohólicos, se han observado incrementos en ciertas citoquinas proinflamatorias, como la MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) así como procesos de reactividad glial (Koga et al., 1978; He and Crews, 2008). Estos datos en humanos, ponen de manifiesto la importancia de nuestros resultados,

y sugieren que la activación glial y los procesos neuroinflamatorios son procesos que se producen también en alcoholismo crónico en humanos.

Un factor importante en la inflamación, es la activación del factor de transcripción nuclear κB conocido como NF- κB , que se puede inducir por la cascada de señalización de TLR4 (Takeda and Akira, 2004). Como se ha comentado en la introducción, la activación de TLR4 estimula la fosforilación y degradación de de I κB - α , dando lugar a la translocación de NF- κB al núcleo y a la transcripción de genes asociados con la respuesta inmune innata y la inflamación (Khorrooshi et al., 2008; Wu et al., 2009). Nuestros datos, muestran que tanto los niveles de I κB - α fosforilados y la translocación de la subunidad de NF- κB /p65 incrementan significativamente tanto en astrocitos estimulados con etanol como en las cortezas cerebrales de los ratones TLR4^{+/+} tratados con alcohol. Además, demostramos que el consumo crónico de alcohol, promueve una activación notable de la cascada de señalización de TLR4/NF- κB en los ratones TLR4^{+/+}. En este caso, la eliminación de la función de TLR4 también previene la activación de NF- κB y la sobreexpresión de citoquinas que causa el alcohol, sugiriendo un papel de la cascada de señalización TLR4/NF- κB en los procesos neuroinflamatorios del cerebro.

La apoptosis celular, es un mecanismo fisiológico conocido como muerte celular programada, proceso importante durante el desarrollo, la organogénesis, la homeostasis celular y el recambio celular. Sin embargo, una apoptosis excesiva suele estar asociada con neurodegeneración (Yuan and Yankner, 2000). A su vez, la neurodegeneración, daño cerebral y neuroinflamación suelen ser procesos asociados, no sólo con aumento en la apoptosis celular, sino con un incremento en la actividad de la enzima efectora, la caspasa-3 (Kothakota et al., 1997; Krajewska et al., 1997; Tang et al., 2007; Louneva et al., 2008; Tang et al., 2008; Lambertsen et al., 2009).

Nuestros hallazgos inmunohistoquímicos en los animales TLR4^{+/+} con tratamiento crónico de etanol, revelan que los procesos neuroinflamatorios generados se producen conjuntamente a la activación de caspasa-3, sugiriendo un aumento en la muerte celular programada. De acuerdo con nuestros resultados obtenidos en animales, en algunos trabajos realizados en muestras postmortem de cerebros alcohólicos, también se ha observado un aumento de células positivas para TUNEL (Ikegami et al., 2003). De manera sorprendente, cuando se elimina la

función de los receptores TLR4 *in vivo* mediante el uso de animales TLR4-KO, se protege contra el aumento de mediadores inflamatorios así como de la activación de la caspasa-3 en corteza cerebral de estos animales, apoyando la hipótesis de que la respuesta del TLR4 desencadena los procesos neuroinflamatorios que participan en la apoptosis. De hecho, algunos estudios indican que la respuesta del TLR4 puede inducir estrés oxidativo y daño neuronal (Haorah et al., 2008), datos que concuerdan con la función esencial del TLR4 en el daño cerebral e incluso neurodegeneración que induce el etanol.

5.1.2. Papel de los co-receptores del TLR4, MD-2 y CD14, en los mecanismos que participan en las acciones del alcohol.

El mecanismo molecular por el que el etanol activa los receptores TLR4, es una de las principales incógnitas en nuestro trabajo. Sin embargo, estudios de nuestro laboratorio han demostrado que el etanol, a concentraciones bajas/moderadas (10-50mM, rango encontrado en personas alcohólicas (Adachi et al., 1991)), actúa como un agonista de los receptores TLR4, capaz de interactuar con ciertos dominios de la membrana ricos en colesterol y esfingolípidos denominados “*lipid rafts o balsas lipídicas*”. Esta interacción facilita la translocación y el reclutamiento de los receptores TLR4/CD14 al igual que las moléculas de señalización (IRAK, MyD88, ERK, NF-κB), desencadenando un aumento en su respuesta. Sin embargo, altas concentraciones de etanol o agentes que disgregan a los *lipid rafts* (estreptolisina-O ó saponina) rompen estos microdominios e inhiben la respuesta y señalización de los TLR4. Este mecanismo lo hemos demostrado tanto en astrocitos (Blanco and Guerri, 2007; Blanco et al., 2008) como en macrófagos (Fernandez-Lizarbe et al., 2008).

Los resultados del presente trabajo, demuestran que los co-receptores del TLR4, el CD14 como el MD-2, participan en la activación de la cascada de señalización de TLR4 inducida por etanol, ya que el silenciamiento de CD14 o del MD-2 (mediante el uso de siRNAs), disminuye la fosforilación de ERK (pERK) y la translocación al núcleo de NF-κB/p65. De hecho, nuestros resultados muestran que el tratamiento crónico de etanol induce una sobreexpresión del CD14 en los ratones TLR4^{+/+}, pero no en los ratones TLR4-KO, lo que apoya el papel del CD14 en la

respuesta del TLR4 inducida por etanol. De hecho, existen estudios que han demostrado que tras la administración de LPS intracraneal, se produce una sobreexpresión de CD14 (Xia et al., 2006).

Los receptores TLR4, además de responder frente a patógenos, también responden a moléculas endógenas como son el fibrinógeno, fibronectina, HSPs, etc. sugiriendo que los TLRs pueden participar en la regulación de los procesos inflamatorios que se desencadenan frente al daño neural (Owens et al., 2005; Tanga et al., 2005). Pensamos, que aunque el etanol, al interactuar con los TLR4 de las células gliales, podría iniciar el proceso inflamatorio, los restos celulares que se originen durante este proceso, podrían interactuar nuevamente con los TLRs amplificando la neuroinflamación y el daño cerebral.

5.1.3. Papel beneficioso y perjudicial de los TLR4 en la respuesta innata inmunitaria.

La respuesta innata inmunitaria asociada a los TLRs y a la inflamación es un proceso beneficioso, contra lesiones, isquemia celular, respuestas autoinmunes o infecciones, causando una secuencia de eventos generalizados, conocida como respuesta de fase aguda, que limita la proliferación de patógenos. Sin embargo, mientras la respuesta inflamatoria, tanto local como generalizada, ofrece claros beneficios en estados infecciosos, una inflamación inapropiada y sostenida en el tiempo, puede causar patologías, y contribuir al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas. De hecho, la eliminación de estos receptores en animales experimentales, protege contra diferentes trastornos neurológicos y neurodegenerativos (Okun et al., 2009), como la isquemia cerebral y neurodegenerativa (Tang et al., 2007; Kilic et al., 2008), enfermedad de Alzheimer (Jin et al., 2008; Tang et al., 2008), el virus de la inmunodeficiencia humana asociado a neurodegeneración (Salaria et al., 2007), etc. Al mismo tiempo, sabemos que la administración de la endotoxina LPS, ligando específico de los receptores TLR4, causa neuroinflamación y neurodegeneración (Lee et al., 2008; Qing et al., 2008). Estos datos sugieren, que una sobreactivación en la respuesta de los TLR4, podría ser la clave en la fisiopatología de muchos trastornos neurológicos y/o

enfermedades neurodegenerativas, incluyendo las alteraciones neurológicas y cognitivas asociadas al consumo de alcohol.

Finalmente, los resultados de este apartado indican que el TLR4 es una diana importante de los efectos neuroinflamatorios del alcohol, aunque los mecanismos de estos procesos son complejos.

5.2 EL INFLAMASOMA NLRP3 PARTICIPA EN LOS MECANISMOS NEUROINFLAMATORIOS ASOCIADOS CON EL ABUSO DE ALCOHOL.

5.2.1. Papel de NLRP3 en los mecanismos neuroinflamatorios que causa el alcohol en el cerebro.

La inflamación del SNC o neuroinflamación, es un proceso que se asocia a la progresión de diversas enfermedades neurológicas como el Alzheimer, la Esclerosis Múltiple, etc. En este proceso participan, la activación de las células gliales (microglía y astrogía), liberación de compuestos inflamatorios y activación de ciertas cascadas de señalización, incluyendo los receptores de membrana TLRs y los citoplásmicos NLRs (Glass et al., 2010). Como hemos descrito, la administración de alcohol, tanto aguda como crónica, activa a las células gliales, libera citoquinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6), compuestos inflamatorios y activa la señalización de los TLRs causando neuroinflamación. Nuestros resultados, también demuestran que la eliminación de los TLR4, protegen en gran parte de los efectos neuroinflamatorios del alcohol.

En los últimos años, se han identificado varias familias de receptores citoplásmicos o sensores, los receptores NLRs, que presentan un dominio unido a nucleótido, repeticiones ricas en leucina, y que participan en la inmunidad innata como defensa frente a procesos de daño e infección. La activación de estos complejos macromoleculares citoplásmicos, también es capaz de producir una respuesta inflamatoria (Martinon et al., 2002). Estos complejos denominados inflamomas, intervienen en la regulación del sistema inmune (Harton et al., 2002; Ting et al., 2006) y participan en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la

obesidad y la diabetes tipo II (Schroder and Tschopp, 2010) e incluso en enfermedades cardiovasculares (Garg, 2011).

El inflammasoma mejor caracterizado y descrito, es el NLRP3 (NALP3 o criopirina). Este complejo se activa en respuesta a diversas señales y moléculas, como las toxinas y ARN de bacterias (Kanneganti et al., 2006), ATP (Mariathasan et al., 2006), ácido úrico (Martinon et al., 2006), beta-amiloide (Halle et al., 2008), etc. Sin embargo, NLRP3 no es capaz de activarse directamente, sino que necesita que se produzca un evento intermediario o perturbación celular causada por ciertas moléculas activadoras (Coll and O'Neill, 2012).

El complejo inflammasoma NLRP3, está compuesto por las proteínas NLR, las moléculas adaptadoras de apoptosis (ASC), y la pro-caspasa-1 (Sutterwala et al., 2006). La activación de la caspasa-1, rompe la pro-IL1 β e induce una liberación de citoquinas proinflamatorias como es la IL-1 β y la IL-18. Para su activación, NLRP3 requiere la inducción o activación de TLR, NLR, y la estimulación de IL-1 β o el TNF- α (Bauernfeind et al., 2009).

En resultados previos del laboratorio, habíamos demostrado que el tratamiento con etanol causaba una liberación de IL-1 β y TNF- α en células gliales y en cerebro, por lo que quisimos evaluar el papel del inflammasoma NLRP3, en la neuroinflamación que induce el alcohol. En el presente trabajo, demostramos que el etanol, a una concentración de 10 mM (concentración con relevancia fisiológica) es capaz de activar la caspasa-1 en astrocitos y liberar la citoquina IL-18 tras 4 y 24 horas de tratamiento, respectivamente. Sin embargo, el uso de la misma concentración de alcohol, causa un retraso en la liberación de IL-18 hasta las 48 horas en astrocitos-TLR4-KO, lo que podría sugerir que el receptor TLR4, acelera o potencia la respuesta del inflammasoma NLRP3.

En apoyo a los estudios en cultivos de astrocitos, nuestros resultados *in vivo* demuestran que el consumo crónico de alcohol, activa en corteza cerebral e hipocampo de ratones TLR4^{+/+} al complejo NLRP3, tal y como lo demuestra el incremento en la expresión de NLRP3, ASC, Caspasa-1, IL-1 β , IL-18, e incluso la liberación de citoquinas IL-18 e IL-1 β . Sin embargo, el alcohol indujo también ciertos cambios en la caspasa-1 y en la IL-1 β en corteza cerebral e hipocampo de ratones TLR4-KO, sugiriendo que aunque los receptores TLR4 inician o potencian

la respuesta del inflamasoma (Coll and O'Neill, 2012), posiblemente otros eventos o receptores, podrían participar en los cambios que observamos en los animales TLR4-KO.

Como resumen a este apartado, nuestros resultados indican que el inflamasoma NLRP3 participa en los procesos de neuroinflamación que causa el alcohol en el cerebro, y que el TLR4 sería necesario, pero no suficiente, para que el alcohol produzca una activación completa del inflamasoma. En el esquema de la Figura 31, se sugiere la posible participación de otras señales celulares (ej. ROS, daño lisosomal, citoquinas, etc.), las cuales podrían activar o potenciar la acción del etanol sobre el inflamasoma NLRP3 y la respuesta innata inmune (Dagenais et al., 2012).

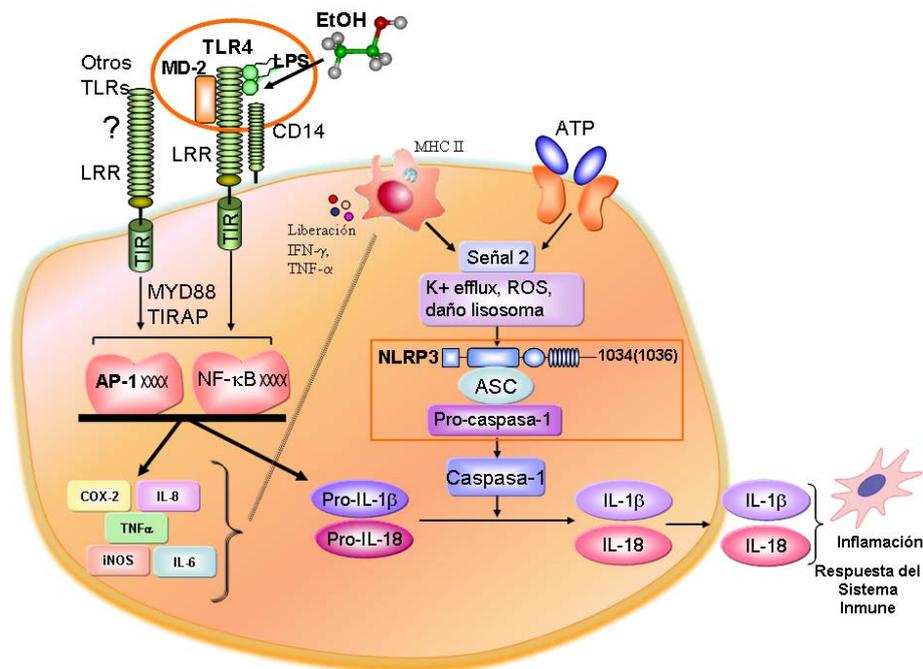


Figura 31: Posible mecanismo de interacción entre el receptor TLR4 y la activación del inflamasoma NLRP3 en los efectos que produce el alcohol. Observamos cómo el etanol (EtOH) es capaz de activar la cascada neuroinflamatoria de los receptores TLR4, liberando citoquinas (Ej. IL-1 β , TNF- α , IL-6) y mediadores proinflamatorios (iNOS, COX-2). A su vez, estas citoquinas e incluso los restos celulares u otras señales (Ej. ATP) pueden activar al inflamasoma NLRP3 e incluso producir una leve infiltración de células inflamatorias en el cerebro (Ej. monocitos/macrófagos (MHCII)). Todos estos procesos, conllevan a un proceso continuado neuroinflamatorio e incluso a mecanismos de neurodegeneración y muerte neuronal.

5.2.2. El consumo crónico de alcohol induce infiltración de células inflamatorias en el cerebro.

La respuesta neuroinflamatoria de los receptores de membrana TLR4, causada por el consumo crónico de alcohol podría amplificarse por la activación del complejo citoplásmico del inflamasoma NLRP3, que desencadenaría la liberación de ciertas citoquinas como la IL-1 β , IL-18, e IL-33. Sin embargo una pregunta que nos planteamos fue ¿qué estímulos desencadenan la activación de este complejo en el cerebro? A este respecto, se han descrito diversas moléculas y estímulos que podrían estimular al inflamasoma (Coll and O'Neill, 2012), entre los que se incluirían radicales libres y otras moléculas liberadas por macrófagos /monocitos, que podrían estar presentes en el cerebro (Mankan et al., 2012). De hecho, el consumo prolongado, además de causar neuroinflamación a través directa de la interacción etanol/TLR4, podría alterar la integridad de la barrera hematoencefálica permitiendo cierta infiltración de células inflamatorias (Ej. macrófagos, leucocitos, etc.) del torrente sanguíneo al cerebro, activando al inflamasoma NLRP3.

Nuestros resultados verifican esta hipótesis, y demuestran que el consumo crónico de alcohol induce en corteza cerebral de ratones TLR4^{+/+} un aumento en la expresión de marcadores de infiltrados, como CD45 (leucocitos), MPO (neutrófilos) y CD68 (macrófagos) así como un aumento del marcador temprano de inflamación IL-33 y de la citoquina IFN- γ , que suele asociarse con la activación de los macrófagos. Además, mediante análisis inmunohistoquímico, observamos la transformación de la microglía de su forma basal a su forma activa. Sin embargo, en los ratones TLR4-KO, sólo encontramos en corteza cerebral una sobreexpresión de MPO (neutrófilos) y de la quimiocina MCP-1 en el hipocampo.

La infiltración de células inmunes en cerebro, podría estar mediada tanto por una alteración en la barrera hematoencefálica como por la respuesta inflamatoria de los TLR4 y producción de citoquinas, que podrían activar tanto al inflamasoma como a la infiltración de células inflamatorias. De hecho, algunos estudios indican que la citoquina IL-1 β promueve la infiltración leucocitaria mediante la inducción de otras citoquinas, quemoquinas y moléculas de adhesión (Shaftel et al., 2007).

Además, la extravasación de leucocitos polimorfonucleados (PMNs) y de monocitos/macrófagos suele venir amplificada por la activación dependiente de IL-18 en las moléculas de adhesión celular-1 (ICAM-1) y en las células endoteliales.

Fenómenos de infiltración de linfocitos/macrófagos, activación astrocitos y microglía a través de los TLRs, producción de citoquinas y quemoquinas, desmielinización y pérdida axonal se observan en algunas enfermedades neurodegenerativas (Sospedra and Martin, 2005; Pittock and Lucchinetti, 2007). Algunos hallazgos recientes indican además, la participación del inflamasoma NLRP3 en enfermedades desmielinizantes como la Esclerosis Múltiple (Jha et al., 2010) y la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (Gris et al., 2011), etc. Estos resultados sugieren, que la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por un abuso de alcohol, podría ser un componente de la neuroinflamación capaz de promover alteraciones en la mielina y desmielinización.

5.3. EL CONSUMO DE ALCOHOL INDUCE REDUCCIÓN DE MATERIA BLANCA Y DEGENERACIÓN AXONAL EN EL CEREBRO.

Numerosos estudios en humanos, han demostrado que el abuso de alcohol reduce la materia blanca, causando alteraciones en la mielina (Pfefferbaum et al., 2010). En la actualidad, los mecanismos por los cuales el alcohol produce estos cambios en la mielina no están esclarecidos.

Nuestros resultados anteriores habían demostrado que el etanol causa daño neuroinflamatorio, mediante la activación del sistema innato inmune, los receptores TLR4 (Alfonso-Loeches et al., 2010) y el inflamasoma en el cerebro. De hecho, evidencias recientes indicaban la asociación entre neuroinflamación y neurodegeneración, incluyendo las alteraciones neurológicas que conllevan a daño de la materia blanca (Peterson and Fujinami, 2007; Glass et al., 2010). En base a estos datos, planteamos la hipótesis de que la neuroinflamación asociada al consumo de alcohol, podría participar en las alteraciones producidas en los procesos de mielinización que se observan en alcohólicos. Los resultados del presente trabajo, demuestran que el tratamiento continuado de alcohol reduce significativamente la expresión de diferentes proteínas que participan en los procesos de mielinización

(PLP, MBP, MOG y MAG) en córtex, hipocampo y cuerpo calloso. Asimismo, fue sorprendente, el encontrar que gran parte de estas alteraciones no se observaban en las mismas áreas cerebrales de ratones deficientes en el receptor TLR4.

Los cambios bioquímicos en las alteraciones de la mielina observados en los ratones TLR4^{+/+} con tratamiento crónico de alcohol, se confirmaron mediante estudios inmunohistoquímicos y de microscopía electrónica. Estos últimos datos, indican que el alcohol induce importantes alteraciones ultraestructurales en la mielina, que se acompañan de una reducción notable de las fibras de MBP en el córtex cerebral y el CC de los ratones TLR4^{+/+}. Además, nuestros resultados demuestran, no sólo que el alcohol produce disfunciones en la mielina, sino que causa la muerte de oligodendrocitos, como se demuestra en los estudios de colocalización realizados, donde observamos un aumento de oligodendrocitos positivos para caspasa-3. En este sentido, merece destacar que los cambios producidos en la mielina y las llamativas alteraciones ultraestructurales de la disposición compacta de las vainas de mielina en las fibras nerviosas, se asocian con la pérdida de neuronas (tinción de Nissl) y con un aumento significativo de las neuronas dañadas y/o en proceso de degeneración (tinción de FluoroJade-B) en la corteza cerebral de los ratones TLR4^{+/+} con consumo crónico de alcohol. Hay que resaltar, que gran parte de las alteraciones en la mielina que mostraban los animales TLR4^{+/+} tratados con etanol, no se observaron en los animales TLR4-KO. Estos resultados, sugerían el posible papel de los receptores TLR4 y la neuroinflamación, en las anomalías de la materia blanca y de la mielina que se observa en alcohólicos.

Las alteraciones en la mielina, las detectamos tanto en machos como en hembras con consumo crónico de alcohol, pero la reducción de las proteínas implicadas en los procesos de mielinización fue más significativa en las hembras que en machos. Estas diferencias de género, resultan consistentes con algunos estudios que sugieren que las mujeres suelen ser más vulnerables que los hombres a los daños cerebrales que produce el alcohol (Schweinsburg et al., 2003; Caldwell et al., 2005).

La mielina, es una sustancia aislante de varias capas que rodea a los axones y acelera la conducción o impulso nervioso, al permitir que los potenciales de acción salten entre las regiones desnudas de los axones (Nódulos de Ranvier) y a lo largo

de los segmentos mielinizados. Este proceso, adquiere un papel relevante en los eventos biológicos asociados al desarrollo del SNC. De hecho, los procesos patológicos que afectan a las vainas mielínicas de las fibras nerviosas, procesos de desmielinización, suelen ser elementos clave que acontecen en distintas enfermedades autoinmunes y/o neurodegenerativas, como son la esclerosis múltiple (Back et al., 2005) o la encefalomiелitis diseminada aguda (Kadhim et al., 2003).

El abuso de alcohol, también se ha demostrado que causa una disminución en la expresión de ciertos genes que codifican a proteínas de la mielina en cerebros postmortem de alcohólicos, efectos que se asocian a una reducción de la materia blanca (de la Monte, 1988; Lewohl et al., 2000; Mayfield et al., 2002). Mediante técnicas de neuroimagen, nuevos trabajos confirman la reducción de materia blanca en córtex y cuerpo caloso, de alcohólicos que no presentan daño hepático (Pfefferbaum et al., 2001; Pfefferbaum et al., 2006b). Además, los estudios de neuroimagen, demuestran que el abuso de alcohol causa alteraciones en la microestructura de la materia blanca del cuerpo caloso (CC) y la corteza cerebral (Pfefferbaum et al., 2006a). Estos últimos hallazgos, confirman nuestros resultados de microscopía electrónica que muestran importantes alteraciones ultraestructurales en la vaina de mielina y en los axones del CC y de la corteza cerebral de ratones TLR4^{+/+}.

Mediante el uso de un sistema de imagen del animal *in vivo*, nuestros resultados también demuestran una reducción importante de PLP en el cerebro de los animales TLR4^{+/+} con consumo crónico de etanol, pero esta reducción en la PLP no se observa en animales TLR4-KO con un mismo tratamiento de alcohol. La proteína PLP, es una de las proteínas mielínicas más abundantes del SNC, y se considera una de las principales dianas antigénicas para los ataques autoinmunes producidos en las enfermedades desmielinizantes del SNC (Greer and Lees, 2002). De hecho, la regulación negativa de algunas de las proteínas mencionadas, se asocia comúnmente con enfermedades desmielinizantes, como es la esclerosis múltiple (Skundric et al., 2008).

Un dato interesante, fue el hallazgo de que el etanol causaba un aumento significativo en los niveles de expresión de NG2 y en el número de células NG2 positivas en la corteza cerebral de animales TLR4^{+/+} y TLR4-KO. El proteoglicano

NG2, se encuentra presente en las células precursoras de oligodendrocitos del SNC (Levine, 1994; Nishiyama et al., 2009; Kang et al., 2010), siendo estas células las que promueven una proliferación de los oligodendrocitos durante el desarrollo del cerebro e incluso en respuesta a procesos de daño cerebral y desmielinización (Kang et al., 2010; Girolamo et al., 2011). De hecho, el proteoglicano NG2 se considera un sensor primario de daño neuronal, que indica cambios neuropatológicos (Wu et al., 2008). Por tanto, es posible que la sobreexpresión de las células NG2 positivas que observamos ante un consumo crónico de alcohol, se pueda asociar a un intento de compensar las disfunciones en la mielina y el daño neural producidos en los ratones TLR4^{+/+} con consumo prolongado de alcohol.

Finalmente, nuestros resultados sugieren que el ambiente neuroinflamatorio inducido por el alcohol, podría desencadenar daño en la mielina, causando procesos de desmielinización y pérdida neuronal, que pueden subyacer tanto a la reducción de la mielina como a las alteraciones microestructurales que se observan en personas con un abuso del alcohol. Pensamos, que tanto la activación del TLR4 como del inflamasoma NLRP3, pueden contribuir a la neuroinflamación asociada al abuso de alcohol (Véase Fig.32). Además, la eliminación de la función de los receptores TLR4, elimina gran parte de los efectos del alcohol sobre las alteraciones de la mielina, aunque permanecen algunos pequeños cambios que posiblemente estarían mediados por el inflamasoma NLRP3, ya que en ausencia del TLR4 el alcohol induce un aumento de la caspasa-1 y de ciertas citoquinas.

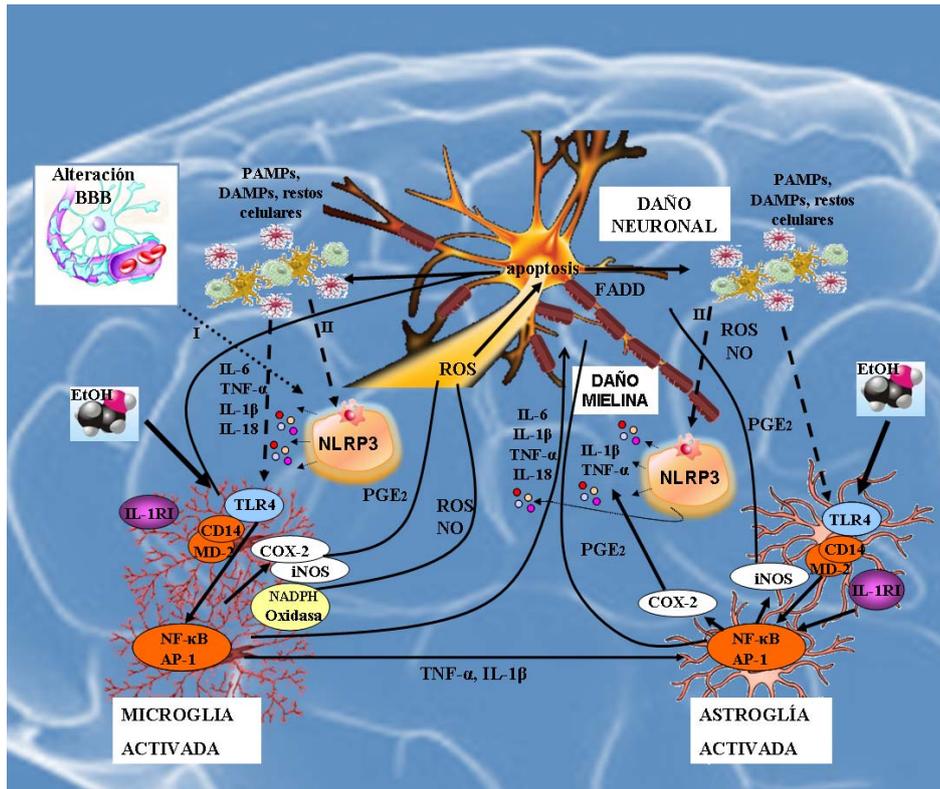


Figura 32: Mecanismos moleculares y celulares implicados en la toxicidad del alcohol en el cerebro. El alcohol (EtOH) es capaz de estimular los receptores TLR4 en células gliales, activando a los astrocitos y a la microglia e induciendo la liberación de mediadores inflamatorios (COX-2, iNOS) citoquinas (IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-18) y radicales libres (ROS, NO). Estos eventos conducen a daño neuronal, pérdida y alteración de la mielina, activación del complejo inflamatorio NLRP3 y presencia de infiltrados, posiblemente causados por una alteración en la barrera hematoencefálica (BBB). Desconocemos si tras un consumo crónico de alcohol, la aparición de infiltrados causa una activación del inflammasoma (I) o si la activación del inflammasoma se produce por otros mecanismos (II), como la presencia de restos celulares o de citoquinas proinflamatorias.

5.4. EL CONSUMO CRÓNICO DE ALCOHOL AFECTA A LOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS.

Evidencias recientes, indican el papel de los mecanismos epigenéticos en los mecanismos de memoria y aprendizaje (Graff and Mansuy, 2009; Malvaez et al., 2009). Además, las alteraciones en la remodelación de la cromatina contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas y alteraciones cognitivas

(Graff and Mansuy, 2009), e incluso de comportamientos adictivos (Renthal and Nestler, 2008). Por tanto, quisimos evaluar si la neuroinflamación que induce el consumo crónico de alcohol se acompañaba con cambios cognitivos y conductuales, así como de deficiencias en la memoria a largo plazo y estados de ansiedad en los ratones, y si estos estaban relacionados con la acetilación de histonas.

Nuestros resultados, demuestran que el consumo de alcohol es similar en los ratones TLR4^{+/+} y TLR4-KO. Sin embargo, observamos que los ratones TLR4^{+/+} tratados crónicamente con etanol, presentaban deficiencias en el aprendizaje y en procesos de memoria, como demuestran la prueba de asociación contextual a un objeto. No obstante, estas disfunciones, no se observaban en los ratones TLR4-KO. Estos resultados sugieren que la activación glial y las disfunciones cognitivas y conductuales son consecuencias del daño neuroinflamatorio que causa el etanol, que incluso persiste a largo plazo, y que esos efectos son dependientes de la función de los receptores TLR4. De acuerdo con nuestros resultados, la neuroinflamación inducida por la administración de LPS (ligando de TLR4), se asocia con deficiencias a largo plazo e incluso disfunciones en la actividad motora. De hecho, la falta de COX-2 (Hayley et al., 2008) y de NOS-2 (Weberpals et al., 2009), importantes mediadores en la señalización de TLR4 (Akira and Takeda, 2004b; Blanco and Guerri, 2007), son capaces de disminuir las alteraciones cognitivas y motrices asociadas con daño cerebral en ratones.

Los TLRs pueden también modular la expresión de mediadores pro y anti-inflamatorios, induciendo cambios en la remodelación de la cromatina (Foster et al., 2007). Nuestros resultados demuestran, que el tratamiento crónico de alcohol disminuye la acetilación de la histona H4 y de la actividad HAT en la corteza prefrontal, estriado e hipocampo de los ratones TLR4^{+/+}. Estos cambios epigenéticos, que se mantienen en la corteza prefrontal tras 15 días de la abstinencia de alcohol, podrían estar modulados por los TLR4, ya que no se observan en ratones TLR4-KO con el mismo tratamiento de etanol. Hay que destacar, que tanto las alteraciones en la acetilación de histonas como la presencia de daño inflamatorio, se han descrito en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la enfermedad de Huntington (Rouaux et al., 2003; Sadri-Vakili et al., 2007; Sweatt, 2010).

Además, observamos que los cambios en la acetilación de la histona H4 que se mantienen tras 15 días de la retirada del alcohol en la dieta, se asocian con conductas de ansiedad y con cambios cognitivos. Estas alteraciones conductuales no se observan en los animales TLR4-KO. Hay que destacar, que cambios en la acetilación de histonas en la corteza prefrontal, se han descrito pueden persistir incluso después de 2 semanas de abstinencia a ciertas drogas (Freeman et al., 2008).

Otros estudios, demuestran que una disminución en la acetilación de histonas y una sobreexpresión de la actividad HDAC en la amígdala, se correlaciona con efectos de ansiedad durante la abstinencia de alcohol ((Pandey et al., 2008). Los cambios en la acetilación de H3 y H4, en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens, se han descrito en ratas adolescentes expuestas intermitentemente al etanol, mientras que no se observan cambios en los animales adultos, sugiriendo el posible papel del TLR4 en estos eventos y en las modificaciones epigenéticas de los animales adolescentes que son especialmente vulnerables a la adicción al alcohol (Pascual et al., 2009). Estos resultados, además ponen de manifiesto que el tipo de administración de etanol (intermitente/crónico) e incluso la duración y el estado de desarrollo del cerebro (adolescente/adulto) podría producir consecuencias funcionales y cambios epigenéticos diferentes ante un consumo de alcohol.

Las citoquinas y el estrés oxidativo, se han asociado con alteraciones conductuales relacionadas con estados de ansiedad y emocionales en ratones (Anisman and Merali, 2003; Rammal et al., 2008). Particularmente, las citoquinas proinflamatorias producidas por la microglía y astrogía, juegan un papel esencial en la respuesta neuroendocrina y conductual frente al estrés (Goshen and Yirmiya, 2009) e incluso se ha relacionado con conductas de ansiedad. Estos resultados, sugieren que la liberación de citoquinas asociadas a la respuesta del TLR4 podría potenciar y mantener los efectos conductuales que induce el alcohol durante el período de abstinencia. Finalmente, nuestros resultados, junto con otros estudios recientes (Anisman and Merali, 2003; Breese et al., 2008; Rammal et al., 2008) sugieren que en las interacciones del alcohol con el sistema inmunitario, son procesos que pueden participar en numerosas acciones del etanol, incluyendo las patologías asociadas al alcohol, alteraciones en la conducta e incluso procesos de adicción. La eliminación funcional de TLR4, no sólo previene del daño hepático

producido por el etanol (Uesugi et al., 2001; Hritz et al., 2008), sino también de la neuroinflamación (Blanco et al., 2005; Fernandez-Lizarbe et al., 2009), daño cerebral (Alfonso-Loeches et al., 2010) y de las alteraciones en la conducta (Pascual et al., 2011). De hecho, los nuevos hallazgos sobre las interacciones del etanol con el sistema neuroinmune pueden ayudar en la búsqueda de nuevas estrategias para paliar los daños funcionales e incluso conductuales asociados al abuso de alcohol.

6. CONCLUSIONES

1.-La eliminación de la función de los receptores TLR4 en astrocitos, mediante el uso de siRNA o células-TLR4-KO, evita la activación de la cascada inflamatoria inducida por el etanol.

2.-Los co-receptores CD14 y MD-2 participan en la activación de la respuesta innata inmune mediada por los receptores TLR4 e inducida por etanol en astrogía y en cerebro.

3.- El consumo crónico de alcohol activa la señalización del TLR4 (MAPK, NF-kB/p65), estimula la microglía y astrogía, aumenta los niveles de citoquinas y mediadores proinflamatorios e incluso activa la actividad de la caspasa-3, causando degeneración y muerte neuronal en corteza cerebral de ratones. La deficiencia de la función de los receptores TLR4 en ratones (TLR4-KO) protege de la neuroinflamación y de gran parte de los efectos que causa el consumo de alcohol en cerebro.

4.-El tratamiento con etanol activa el complejo citosólico del inflammasoma NLRP3/Casp1, en astrocitos en cultivo y en la corteza cerebral e hipocampo de ratones TLR4^{+/+}. Dicha activación es muy leve en animales TLR4-KO. Los resultados indican que los TLR4 potencian la respuesta neuroinflamatoria del complejo NLRP3/Casp1, y que los TLR4 son necesarios pero no suficientes para que el alcohol produzca una activación completa de este complejo citosólico.

5.-El consumo crónico de alcohol, causa una infiltración celular de polimorfonucleados (leucocitos, neutrófilos, etc.) y macrófagos en cerebro.

6.- El receptor TLR4 participa en los procesos de desmielinización asociados al abuso de alcohol en cerebro, produciendo una reducción en los niveles de diferentes proteínas de mielina, alteraciones morfológicas, cambios estructurales de las fibras mielínicas, notable reducción en la materia blanca, degeneración axonal y muerte neuronal asociada.

7.-La neuroinflamación y la neurodegeneración que induce el consumo crónico de alcohol, causa cambios epigenéticos en la acetilación de histonas y estos cambios se correlacionan con alteraciones cognitivas y conductuales.

8.- La eliminación de la función de los TLR4, protege en gran parte de la neuroinflamación y de las alteraciones en la mielina y daño neuronal que se asocian con el abuso de alcohol.

9.- Finalmente, aunque los mecanismos por los que el alcohol causa daño cerebral son complejos, la activación del sistema innato inmune y de los receptores TLR4 en el cerebro desempeñan un papel crucial en la neuroinflamación y en el daño cerebral que conlleva el abuso de alcohol. Por tanto, los receptores TLR4 pueden representar una buena diana terapéutica para paliar o tratar ciertas patologías asociadas al consumo de

alcohol, como la hepatopatía, la reducción en la materia blanca, el daño cerebral y las alteraciones cognitivas y conductuales asociadas con el abuso de alcohol.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abernathy K, Chandler LJ, Woodward JJ (2010) Alcohol and the prefrontal cortex. *Int Rev Neurobiol* 91:289-320.
- Adachi J, Mizoi Y, Fukunaga T, Ogawa Y, Ueno Y, Imamichi H (1991) Degrees of alcohol intoxication in 117 hospitalized cases. *J Stud Alcohol* 52:448-453.
- Akira S, Takeda K (2004a) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
- Akira S, Takeda K (2004b) Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C R Biol* 327:581-589.
- Albano E (2012) Role of adaptive immunity in alcoholic liver disease. *Int J Hepatol* 2012:893026.
- Alexander-Kaufman K, James G, Sheedy D, Harper C, Matsumoto I (2006) Differential protein expression in the prefrontal white matter of human alcoholics: a proteomics study. *Mol. Psychiatry* 11:56-65.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413:732-738.
- Alfonso-Loeches S, Guerri C (2011) Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci* 48:19-47.
- Alfonso-Loeches S, Pascual-Lucas M, Blanco AM, Sanchez-Vera I, Guerri C (2010) Pivotal role of TLR4 receptors in alcohol-induced neuroinflammation and brain damage. *J Neurosci* 30:8285-8295.
- Anisman H, Merali Z (2003) Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. *Ann Med* 35:2-11.
- Arbelaez A, Pajon A, Castillo M (2003) Acute Marchiafava-Bignami disease: MR findings in two patients. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:1955-1957.

- Babcock AA, Wirenfeltdt M, Holm T, Nielsen HH, Dissing-Olesen L, Toft-Hansen H, Millward JM, Landmann R, Rivest S, Finsen B, Owens T (2006) Toll-like receptor 2 signaling in response to brain injury: an innate bridge to neuroinflammation. *J Neurosci* 26:12826-12837.
- Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Jr., Rao MS, Sherman LS (2005) Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11:966-972.
- Barcia C, Ros F, Carrillo MA, Aguado-Llera D, Ros CM, Gomez A, Nombela C, de Pablos V, Fernandez-Villalba E, Herrero MT (2009) Inflammatory response in Parkinsonism. *J Neural Transm Suppl*:245-252.
- Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E (2009) Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 183:787-791.
- Benveniste EN (1992) Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol* 263:C1-16.
- Benveniste EN (1998) Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:259-275.
- Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol* 24:353-389.
- Blanco AM, 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 AM, Valles SL, Pascual M, Guerri C (2005) Involvement of TLR4/type I IL-1 receptor signaling in the induction of inflammatory mediators and cell death induced by ethanol in cultured astrocytes. *J Immunol* 175:6893-6899.
- Blanco AM, Perez-Arago A, Fernandez-Lizarbe S, Guerri C (2008) Ethanol mimics ligand-mediated activation and endocytosis of IL-1RI/TLR4 receptors via lipid rafts caveolae in astroglial cells. *J Neurochem* 106:625-639.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Breese GR, Knapp DJ, Overstreet DH, Navarro M, Wills TA, Angel RA (2008) Repeated lipopolysaccharide (LPS) or cytokine treatments sensitize ethanol withdrawal-induced anxiety-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 33:867-876.
- Brooks PJ (2000) Brain atrophy and neuronal loss in alcoholism: a role for DNA damage? *Neurochem Int* 37:403-412.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021.
- Caldwell LC, Schweinsburg AD, Nagel BJ, Barlett VC, Brown SA, Tapert SF (2005) Gender and adolescent alcohol use disorders on BOLD (blood oxygen level dependent) response to spatial working memory. *Alcohol Alcohol* 40:194-200.
- Campbell A (2004) Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann N Y Acad Sci* 1035:117-132.
- Cao F, Castrillo A, Tontono P, Re F, Byrne GI (2007) Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:753-759.

- Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD (2008) Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun* 22:140-147.
- Casella GT, Bunge MB, Wood PM (2004) Improved immunocytochemical identification of neural, endothelial, and inflammatory cell types in paraffin-embedded injured adult rat spinal cord. *J Neurosci Methods* 139:1-11.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Coll RC, O'Neill LA (2012) The cytokine release inhibitory drug CRID3 targets ASC oligomerisation in the NLRP3 and AIM2 inflammasomes. *PLoS One* 6:e29539.
- Crews FT, Nixon K (2009) Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol* 44:115-127.
- Crews FT, Collins MA, Dlugos C, Littleton J, Wilkins L, Neafsey EJ, Pentney R, Snell LD, Tabakoff B, Zou J, Noronha A (2004) Alcohol-induced neurodegeneration: when, where and why? *Alcohol Clin Exp Res* 28:350-364.
- Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD (2000) NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 20:6404-6412.
- Chen GY, Nunez G (2010) Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10:826-837.
- Chen H, Koustova E, Shults C, Sailhamer EA, Alam HB (2007) Differential effect of resuscitation on Toll-like receptors in a model of hemorrhagic shock without a septic challenge. *Resuscitation* 74:526-537.

- Church LD, Cook GP, McDermott MF (2008) Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:34-42.
- Chvatal A, Anderova M, Kirchhoff F (2007) Three-dimensional confocal morphometry - a new approach for studying dynamic changes in cell morphology in brain slices. *J Anat* 210:671-683.
- Dagenais M, Skeldon A, Saleh M (2012) The inflammasome: in memory of Dr. Jurg Tschopp. *Cell Death Differ* 19:5-12.
- Dalgleish AG, O'Byrne K (2006) Inflammation and cancer: the role of the immune response and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 130:1-38.
- Damjanac M, Rioux Bilan A, Barrier L, Pontcharraud R, Anne C, Hugon J, Page G (2007) Fluoro-Jade B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1128:40-49.
- de la Monte SM (1988) Disproportionate atrophy of cerebral white matter in chronic alcoholics. *Arch Neurol* 45:990-992.
- Dietrich J, Lacagnina M, Gass D, Richfield E, Mayer-Proschel M, Noble M, Torres C, Proschel C (2005) EIF2B5 mutations compromise GFAP+ astrocyte generation in vanishing white matter leukodystrophy. *Nat Med* 11:277-283.
- Dinarello CA (2006) Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr* 83:447S-455S.
- Dixon DR, Darveau RP (2005) Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res* 84:584-595.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180-190.

- Drenth JP, van der Meer JW (2006) The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med* 355:730-732.
- Dunne A, O'Neill LA (2003) The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003:re3.
- Ende G, Walter S, Welzel H, Demirakca T, Wokrina T, Ruf M, Ulrich M, Diehl A, Henn FA, Mann K (2006) Alcohol consumption significantly influences the MR signal of frontal choline-containing compounds. *Neuroimage* 32:740-746.
- Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA, Thurman RG (2001) Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 25:1360-1367.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.
- Felts PA, Woolston AM, Fernando HB, Asquith S, Gregson NA, Mizzi OJ, Smith KJ (2005) Inflammation and primary demyelination induced by the intraspinal injection of lipopolysaccharide. *Brain* 128:1649-1666.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Guerri C (2009) Critical role of TLR4 response in the activation of microglia induced by ethanol. *J Immunol* 183:4733-4744.
- Fernandez-Lizarbe S, Pascual M, Gascon MS, Blanco A, Guerri C (2008) Lipid rafts regulate ethanol-induced activation of TLR4 signaling in murine macrophages. *Mol Immunol* 45:2007-2016.
- Foster SL, Hargreaves DC, Medzhitov R (2007) Gene-specific control of inflammation by TLR-induced chromatin modifications. *Nature* 447:972-978.

- Franchi L, Munoz-Planillo R, Nunez G (2012) Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nat Immunol* 13:325-332.
- Franchi L, Warner N, Viani K, Nunez G (2009) Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 227:106-128.
- Freeman WM, Patel KM, Brucklacher RM, Lull ME, Erwin M, Morgan D, Roberts DC, Vrana KE (2008) Persistent alterations in mesolimbic gene expression with abstinence from cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology* 33:1807-1817.
- Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE (2006) Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol* 7:1250-1257.
- Gangloff M, Gay NJ (2004) MD-2: the Toll 'gatekeeper' in endotoxin signalling. *Trends Biochem Sci* 29:294-300.
- Garg NJ (2011) Inflammasomes in cardiovascular diseases. *Am J Cardiovasc Dis* 1:244-254.
- Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF (1998) Inflammation in traumatic brain injury: role of cytokines and chemokines. *Neurochem Res* 23:329-340.
- Giovannini MG, Scali C, Prosperi C, Bellucci A, Pepeu G, Casamenti F (2003) Experimental brain inflammation and neurodegeneration as model of Alzheimer's disease: protective effects of selective COX-2 inhibitors. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16:31-40.
- Girolamo F, Strippoli M, Errede M, Benagiano V, Roncali L, Ambrosi G, Virgintino D (2011) Characterization of oligodendrocyte lineage precursor cells in the mouse cerebral cortex: a confocal microscopy approach to demyelinating diseases. *Ital J Anat Embryol* 115:95-102.

- Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell* 140:918-934.
- Gong JP, Dai LL, Liu CA, Wu CX, Shi YJ, Li SW, Li XH (2002) Expression of CD14 protein and its gene in liver sinusoidal endothelial cells during endotoxemia. *World J Gastroenterol* 8:551-554.
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-Estrada J (2002) Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci Lett* 321:100-104.
- Goshen I, Yirmiya R (2009) Interleukin-1 (IL-1): a central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol* 30:30-45.
- Graeber MB, Li W, Rodriguez ML (2011) Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett* 585:3798-3805.
- Graff J, Mansuy IM (2009) Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci* 30:1-8.
- Graff J, Rei D, Guan JS, Wang WY, Seo J, Hennig KM, Nieland TJ, Fass DM, Kao PF, Kahn M, Su SC, Samiei A, Joseph N, Haggarty SJ, Delalle I, Tsai LH (2012) An epigenetic blockade of cognitive functions in the neurodegenerating brain. *Nature* 483:222-226.
- Greer JM, Lees MB (2002) Myelin proteolipid protein--the first 50 years. *Int J Biochem Cell Biol* 34:211-215.
- Griffiths M, Neal JW, Gasque P (2007) Innate immunity and protective neuroinflammation: new emphasis on the role of neuroimmune regulatory proteins. *Int Rev Neurobiol* 82:29-55.
- Gris D, Ye Z, Iocca HA, Wen H, Craven RR, Gris P, Huang M, Schneider M, Miller SD, Ting JP (2011) NLRP3 plays a

critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol* 185:974-981.

- Gruber A, Mancek M, Wagner H, Kirschning CJ, Jerala R (2004) Structural model of MD-2 and functional role of its basic amino acid clusters involved in cellular lipopolysaccharide recognition. *J Biol Chem* 279:28475-28482.
- Guerra C (2002) Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox Res* 4:327-335.
- Guerra C (2009) [New informative and prevention programs in Europe to reduce the risks associated to alcohol consumption during pregnancy and the appearance of Foetal Alcohol Spectrum Disorders]. *Adicciones* 22:97-99.
- Guerra C, Pascual M (2010) Mechanisms involved in the neurotoxic, cognitive, and neurobehavioral effects of alcohol consumption during adolescence. *Alcohol* 44:15-26.
- Guerra C, Montoliu C, Renau-Piqueras J (1994) Involvement of free radical mechanism in the toxic effects of alcohol: implications for fetal alcohol syndrome. *Adv Exp Med Biol* 366:291-305.
- Guerra C, Bazinet A, Riley EP (2009) Foetal Alcohol Spectrum Disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol* 44:108-114.
- Guerra C, Pascual M, Garcia-Minguillan M, Charness ME, Wilkemeyer MF, Klintsova AY, Goodlett CR, Greenough WT, Sakata-Haga H, Dominguez HD, Thomas JD (2005) Fetal alcohol effects: Potential treatments from basic science. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1074.
- Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the

innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* 9:857-865.

Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40:140-155.

Haorah J, Knipe B, Gorantla S, Zheng J, Persidsky Y (2007) Alcohol-induced blood-brain barrier dysfunction is mediated via inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP3R)-gated intracellular calcium release. *J Neurochem* 100:324-336.

Haorah J, Ramirez SH, Floreani N, Gorantla S, Morsey B, Persidsky Y (2008) Mechanism of alcohol-induced oxidative stress and neuronal injury. *Free Radic Biol Med* 45:1542-1550.

Harper C (2009) The neuropathology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol* 44:136-140.

Harper C, Matsumoto I (2005) Ethanol and brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 5:73-78.

Harton JA, Linhoff MW, Zhang J, Ting JP (2002) Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains. *J Immunol* 169:4088-4093.

Hartung HP (2001) [Current status of interferon beta-1b in multiple sclerosis therapy]. *Med Klin (Munich)* 96 Suppl 1:11-16.

Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev* 48:220-233.

Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A (2003) A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated

with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 198:1563-1572.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A (2001) The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410:1099-1103.

Hayley S, Mangano E, Strickland M, Anisman H (2008) Lipopolysaccharide and a social stressor influence behaviour, corticosterone and cytokine levels: divergent actions in cyclooxygenase-2 deficient mice and wild type controls. *J Neuroimmunol* 197:29-36.

He J, Crews FT (2008) Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp Neurol* 210:349-358.

Heales SJ, Bolanos JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB (1999) Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1410:215-228.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.

Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, Van Leuven F (2005) Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* 2:22.

Hoffman HM, Brydges SD (2011) Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. *J Biol Chem* 286:10889-10896.

Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, Kurt-Jones E, 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.

Hunot S, Hirsch EC (2003) Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53 Suppl 3:S49-58; discussion S58-60.

Ikegami Y, Goodenough S, Inoue Y, Dodd PR, Wilce PA, Matsumoto I (2003) Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neurosci Lett* 349:201-205.

Inohara, Chamailard, McDonald C, Nunez G (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 74:355-383.

Inohara N, Nunez G (2002) ML -- a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 27:219-221.

Irving EA, Bentley DL, Parsons AA (2001) Assessment of white matter injury following prolonged focal cerebral ischaemia in the rat. *Acta Neuropathol* 102:627-635.

Ishida A, Fujita N, Kitazawa R, Tsuruo T (2002) Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem* 277:26217-26224.

Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, Antel JP (2005) Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81:363-373.

Jha S, Ting JP (2009) Inflammasome-associated nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat proteins and inflammatory diseases. *J Immunol* 183:7623-7629.

Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, Chen VS, Gris D, Matsushima GK, Ting JP (2010) The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J Neurosci* 30:15811-15820.

- Jiao Y, Sun Z, Lee T, Fusco FR, Kimble TD, Meade CA, Cuthbertson S, Reiner A (1999) A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J Neurosci Methods* 93:149-162.
- Jin JJ, Kim HD, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K (2008) Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 5:23.
- Jones KL, Smith DW (1973) Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet* 302:999-1001.
- Joshi PC, Guidot DM (2007) The alcoholic lung: epidemiology, pathophysiology, and potential therapies. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L813-823.
- Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S (2002) Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3:499.
- Kadhim H, De Prez C, Gazagnes MD, Sebire G (2003) In situ cytokine immune responses in acute disseminated encephalomyelitis: insights into pathophysiologic mechanisms. *Hum Pathol* 34:293-297.
- Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE (2010) NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68:668-681.
- Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park JH, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, Nunez G (2006) Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA. *J Biol Chem* 281:36560-36568.
- Kawai T, Akira S (2006) TLR signaling. *Cell Death Differ* 13:816-825.

- Khorooshi R, Babcock AA, Owens T (2008) NF-kappaB-driven STAT2 and CCL2 expression in astrocytes in response to brain injury. *J Immunol* 181:7284-7291.
- Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI (1991) Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 13:267-276.
- Kielian T (2006) Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res* 83:711-730.
- Kielian T, Mayes P, Kielian M (2002) Characterization of microglial responses to *Staphylococcus aureus*: effects on cytokine, costimulatory molecule, and Toll-like receptor expression. *J Neuroimmunol* 130:86-99.
- Kilic U, Kilic E, Matter CM, Bassetti CL, Hermann DM (2008) TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 31:33-40.
- Koga Y, Akiyoshi T, Nagae K, Mizobuchi H, Toshima H (1978) [Acute effects of propranolol on the abnormal diastolic hemodynamics of the left ventricle in hypertrophic cardiomyopathy (author's transl)]. *Kokyu To Junkan* 26:473-476.
- Korbo L (1999) Glial cell loss in the hippocampus of alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 23:164-168.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.
- Kracht M, Saklatvala J (2002) Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine* 20:91-106.

- Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC (1997) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res* 57:1605-1613.
- Kril JJ, Halliday GM (1999) Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog Neurobiol* 58:381-387.
- Kril JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Cartwright H (1997) The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 79:983-998.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 29:1319-1330.
- Lee JW, Lee YK, Yuk DY, Choi DY, Ban SB, Oh KW, Hong JT (2008) Neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment through enhancement of beta-amyloid generation. *J Neuroinflammation* 5:37.
- Lee KH, Chang SY, Roberts DW, Kim U (2004) Neurotransmitter release from high-frequency stimulation of the subthalamic nucleus. *J Neurosurg* 101:511-517.
- Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, 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.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.

- Levine JM (1994) Increased expression of the NG2 chondroitin-sulfate proteoglycan after brain injury. *J Neurosci* 14:4716-4730.
- Lewohl JM, Wixey J, Harper CG, Dodd PR (2005) Expression of MBP, PLP, MAG, CNP, and GFAP in the Human Alcoholic Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1698-1705.
- Lewohl JM, Wang L, Miles MF, Zhang L, Dodd PR, Harris RA (2000) Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 24:1873-1882.
- Lingel A, Fairbrother WJ (2009) NMR assignments of the human cytokine interleukin-33. *Biomol NMR Assign* 3:223-225.
- Litman GW, Cannon JP, Dishaw LJ (2005) Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nat Rev Immunol* 5:866-879.
- Liu J, Lewohl JM, Harris RA, Iyer VR, Dodd PR, Randall PK, Mayfield RD (2006) Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology* 31:1574-1582.
- Louneva N, Cohen JW, Han LY, Talbot K, Wilson RS, Bennett DA, Trojanowski JQ, Arnold SE (2008) Caspase-3 is enriched in postsynaptic densities and increased in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 173:1488-1495.
- Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707-717.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 198:513-520.

- Malvaez M, Barrett RM, Wood MA, Sanchis-Segura C (2009) Epigenetic mechanisms underlying extinction of memory and drug-seeking behavior. *Mamm Genome* 20:612-623.
- Mandrekar P, Dolganiuc A, Bellerose G, Kodys K, Romics L, Nizamani R, Szabo G (2002) Acute alcohol inhibits the induction of nuclear regulatory factor 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.
- Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V (2012) The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1beta processing in neutrophils. *Eur J Immunol* 42:710-715.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2006) Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2:679-689.
- Mariathasan S, Weiss DS, Newton K, McBride J, O'Rourke K, Roose-Girma M, Lee WP, Weinrauch Y, Monack DM, Dixit VM (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440:228-232.
- Marta M, Meier UC, Lobell A (2009) Regulation of autoimmune encephalomyelitis by toll-like receptors. *Autoimmun Rev* 8:506-509.
- Martin PR, Singleton CK, Hiller-Sturmhofel S (2003) The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res Health* 27:134-142.
- Martinon F, Tschopp J (2007) Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death Differ* 14:10-22.
- Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10:417-426.

- Martinon F, Mayor A, Tschopp J (2009) The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 27:229-265.
- Martinon F, Petrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006) Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440:237-241.
- Masters SL, O'Neill LA (2011) Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome. *Trends Mol Med* 17:276-282.
- Matsushita S, Higuchi S (2007) [A review of the neuroimaging studies of alcoholism]. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi* 42:615-621.
- Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A, Liu J, Harris RA (2002) Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J Neurochem* 81:802-813.
- McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5:45.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Merrill JE, Benveniste EN (1996) Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19:331-338.
- Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Andrew M, Overholser JC, Jurjus G, Stockmeier CA, Rajkowska G (2002) Glia pathology in the prefrontal cortex in alcohol dependence with and without depressive symptoms. *Biol Psychiatry* 52:1121-1133.

- Minana R, Duran JM, Tomas M, Renau-Piqueras J, Guerri C (2001) Neural cell adhesion molecule is endocytosed via a clathrin-dependent pathway. *Eur J Neurosci* 13:749-756.
- Mishra BB, Gundra UM, Teale JM (2008) Expression and distribution of Toll-like receptors 11-13 in the brain during murine neurocysticercosis. *J Neuroinflammation* 5:53.
- Montoliu C, Kosenko E, Calvete JJ, Nies AT, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM, Felipo V (2004) Increased protein kinase A regulatory subunit content and cGMP binding in erythrocyte membranes in liver cirrhosis. *J Hepatol* 40:766-773.
- Moss M, Parsons PE, Steinberg KP, Hudson LD, Guidot DM, Burnham EL, Eaton S, Cotsonis GA (2003) Chronic alcohol abuse is associated with an increased incidence of acute respiratory distress syndrome and severity of multiple organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care Med* 31:869-877.
- Mrak RE, Griffin WS (2005) Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 8:369-375.
- Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, Ogata M, Iwakura Y, Akira S, Kitamura T, Kosugi A, Kimoto M, Miyake K (2002) Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3:667-672.
- Naik E, Dixit VM (2010) Modulation of inflammasome activity for the treatment of auto-inflammatory disorders. *J Clin Immunol* 30:485-490.
- Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM (2011) Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 12:222-230.

- Nakajima K, Kohsaka S (2001) Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J Biochem* 130:169-175.
- Neven B, Callebaut I, Prieur AM, Feldmann J, Bodemer C, Lepore L, Derfalvi B, Benjaponpitak S, Vesely R, Sauvain MJ, Oertle S, Allen R, Morgan G, Borkhardt A, Hill C, Gardner-Medwin J, Fischer A, de Saint Basile G (2004) Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* 103:2809-2815.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216-227.
- Nishiyama A, Komitova M, Suzuki R, Zhu X (2009) Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nat Rev Neurosci* 10:9-22.
- O'Banion MK (1999) COX-2 and Alzheimer's disease: potential roles in inflammation and neurodegeneration. *Expert Opin Investig Drugs* 8:1521-1536.
- O'Neill LA (2003) The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans* 31:643-647.
- O'Neill LA, Dinarello CA (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today* 21:206-209.
- Oak S, Mandrekar P, Catalano D, Kodys K, 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 KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV (2009) Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev* 59:278-292.

- Ooigawa H, Nawashiro H, Fukui S, Otani N, Osumi A, Toyooka T, Shima K (2006) The fate of Nissl-stained dark neurons following traumatic brain injury in rats: difference between neocortex and hippocampus regarding survival rate. *Acta Neuropathol* 112:471-481.
- Otani N, Nawashiro H, Fukui S, Ooigawa H, Ohsumi A, Toyooka T, Shima K, Gomi H, Brenner M (2006) Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *J Clin Neurosci* 13:934-938.
- Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H (2005) Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Brain Res Rev* 48:178-184.
- Palmer G, Gabay C (2011) Interleukin-33 biology with potential insights into human diseases. *Nat Rev Rheumatol* 7:321-329.
- Pandey SC, Ugale R, Zhang H, Tang L, Prakash A (2008) Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism. *J Neurosci* 28:3729-3737.
- Pang M, Bala S, Kodys K, Catalano D, Szabo G (2011) Inhibition of TLR8- and TLR4-induced Type I IFN induction by alcohol is different from its effects on inflammatory cytokine production in monocytes. *BMC Immunol* 12:55.
- Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H, Lee JO (2009) The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458:1191-1195.
- Pascual M, 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, Boix J, Felipe V, Guerri C (2009) Repeated alcohol administration during adolescence causes changes in the mesolimbic dopaminergic and glutamatergic systems and

promotes alcohol intake in the adult rat. *J Neurochem* 108:920-931.

Pascual M, Balino P, Alfonso-Loeches S, Aragon CM, Guerri C (2011) Impact of TLR4 on behavioral and cognitive dysfunctions associated with alcohol-induced neuroinflammatory damage. *Brain Behav Immun* 25 Suppl 1:S80-91.

Pascual M, Do Couto BR, Alfonso-Loeches S, Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Guerri C (2012) Changes in histone acetylation in the prefrontal cortex of ethanol-exposed adolescent rats are associated with ethanol-induced place conditioning. *Neuropharmacology* 62:2309-2319.

Patel HC, Boutin H, Allan SM (2003) Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 992:39-47.

Pediatrics AAO (2000) American Academy of Pediatrics. Committee on Substance Abuse and Committee on Children With Disabilities. Fetal alcohol syndrome and alcohol-related neurodevelopmental disorders. *Pediatrics* 106:358-361.

Perera PY, Mayadas TN, Takeuchi O, Akira S, Zaks-Zilberman M, Goyert SM, Vogel SN (2001) CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J Immunol* 166:574-581.

Perkins ND (2000) The Rel/NF-kappa B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 25:434-440.

Perret M, Badiou C, Lina G, Burbaud S, Benito Y, Bes M, Cottin V, Couzon F, Juruj C, Dauwalder O, Goutagny N, Diep BA, Vandenesch F, Henry T (2011) Cross-talk between *Staphylococcus aureus* leukocidins-intoxicated macrophages and lung epithelial cells triggers chemokine secretion in an inflammasome-dependent manner. *Cell Microbiol*.

- Peterson LK, Fujinami RS (2007) Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 184:37-44.
- Pfefferbaum A (2004) Alcoholism damages the brain, but does moderate alcohol use? *Lancet Neurol* 3:143-144.
- Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Sullivan EV (2006a) Supratentorial profile of white matter microstructural integrity in recovering alcoholic men and women. *Biol Psychiatry* 59:364-372.
- Pfefferbaum A, Adalsteinsson E, Sullivan EV (2006b) Dymorphology and microstructural degradation of the corpus callosum: Interaction of age and alcoholism. *Neurobiol Aging* 27:994-1009.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom M, Deshmukh A, Sullivan E (2001) Sex differences in the effects of alcohol on brain structure. *Am J Psychiatry* 158:188-197.
- Pfefferbaum A, Rosenbloom MJ, Fama R, Sassoon SA, Sullivan EV (2010) Transcallosal white matter degradation detected with quantitative fiber tracking in alcoholic men and women: selective relations to dissociable functions. *Alcohol Clin Exp Res* 34:1201-1211.
- Pittock SJ, Lucchinetti CF (2007) The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* 13:45-56.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Popova EN (2005) Ultrastructure of the sensorimotor cortex of pubertal offspring of alcoholic male rats. *Neurosci Behav Physiol* 35:877-880.

- Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP (2001) Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36:145-155.
- Przedborski S, Vila M (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:189-198.
- Qin L, He J, Hanes RN, Pluzarev O, Hong JS, Crews FT (2008) Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* 5:10.
- Qing X, Pitashny M, Thomas DB, Barrat FJ, Hogarth MP, Putterman C (2008) Pathogenic anti-DNA antibodies modulate gene expression in mesangial cells: involvement of HMGB1 in anti-DNA antibody-induced renal injury. *Immunol Lett* 121:61-73.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R (2008) Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun* 22:1156-1159.
- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27:119-145.
- Reed MG, Howard CV (1998) Surface-weighted star volume: concept and estimation. *J Microsc* 190:350-356.
- Renthal W, Nestler EJ (2008) Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med* 14:341-350.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci* 20:570-577.
- Rifkin IR, Leadbetter EA, Busconi L, Viglianti G, Marshak-Rothstein A (2005) Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol Rev* 204:27-42.

- Rivest S (2003) Molecular insights on the cerebral innate immune system. *Brain Behav Immun* 17:13-19.
- Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, Felipo V (2010) Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139:675-684.
- Rodriguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A (2009) Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 16:378-385.
- Romero AM, Esteban-Pretel G, Marin MP, Ponsoda X, Ballestin R, Canales JJ, Renau-Piqueras J (2010) Chronic ethanol exposure alters the levels, assembly, and cellular organization of the actin cytoskeleton and microtubules in hippocampal neurons in primary culture. *Toxicol Sci* 118:602-612.
- Rosenbloom M, Sullivan EV, Pfefferbaum A (2003) Using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging to assess brain damage in alcoholics. *Alcohol Res Health* 27:146-152.
- Rouaux C, Jokic N, Mbebi C, Boutillier S, Loeffler JP, Boutillier AL (2003) Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *Embo J* 22:6537-6549.
- Sadri-Vakili G, Bouzou B, Benn CL, Kim MO, Chawla P, Overland RP, Glajch KE, Xia E, Qiu Z, Hersch SM, Clark TW, Yohrling GJ, Cha JH (2007) Histones associated with downregulated genes are hypo-acetylated in Huntington's disease models. *Hum Mol Genet* 16:1293-1306.
- Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11:775-787.
- Saijo K, Winner B, Carson CT, Collier JG, Boyer L, Rosenfeld MG, Gage FH, Glass CK (2009) A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death. *Cell* 137:47-59.

- Salaria S, Badkoobehi H, Rockenstein E, Crews L, Chana G, Masliah E, Everall IP (2007) Toll-like receptor pathway gene expression is associated with human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration. *J Neurovirol* 13:496-503.
- Schmued LC, Hopkins KJ (2000) Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 874:123-130.
- Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140:821-832.
- Schroder K, Zhou R, Tschopp J (2010) The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science* 327:296-300.
- Schweinsburg BC, Alhassoon OM, Taylor MJ, Gonzalez R, Videen JS, Brown GG, Patterson TL, Grant I (2003) Effects of alcoholism and gender on brain metabolism. *Am J Psychiatry* 160:1180-1183.
- Sen GC, Sarkar SN (2005) Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:1-14.
- Shaftel SS, Carlson TJ, Olschowka JA, Kyrkanides S, Matousek SB, O'Banion MK (2007) Chronic interleukin-1beta expression in mouse brain leads to leukocyte infiltration and neutrophil-independent blood brain barrier permeability without overt neurodegeneration. *J Neurosci* 27:9301-9309.
- Shi SR, Cote RJ, Taylor CR (2001) Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J Histochem Cytochem* 49:931-937.
- Skundric DS, Dai R, Zakarian VL, Zhou W (2008) Autoimmune-induced preferential depletion of myelin-associated glycoprotein (MAG) is genetically regulated in relapsing EAE (B6 x SJL) F1 mice. *Mol Neurodegener* 3:7.
- Sloane JA, Batt C, Ma Y, Harris ZM, Trapp B, Vartanian T (2010) Hyaluronan blocks oligodendrocyte progenitor maturation and

remyelination through TLR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:11555-11560.

Sofroniew MV (2009) Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci* 32:638-647.

Sokol RJ, Delaney-Black V, Nordstrom B (2003) Fetal alcohol spectrum disorder. *Jama* 290:2996-2999.

Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.

Sripathirathan K, Brown J, 3rd, Neafsey EJ, Collins MA (2009) Linking binge alcohol-induced neurodamage to brain edema and potential aquaporin-4 upregulation: evidence in rat organotypic brain slice cultures and in vivo. *J Neurotrauma* 26:261-273.

Stoeck K, Bodemer M, Zerr I (2006) Pro- and anti-inflammatory cytokines in the CSF of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuroimmunol* 172:175-181.

Stoll G, Jander S, Schroeter M (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol* 513:87-113.

Streit WJ, Mrak RE, Griffin WS (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation* 1:14.

Sullivan EV, Pfefferbaum A (2005) Neurocircuitry in alcoholism: a substrate of disruption and repair. *Psychopharmacology (Berl)* 180:583-594.

Sutterwala FS, Ogura Y, Szczepanik M, Lara-Tejero M, Lichtenberger GS, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Galan JE, Askenase PW, Flavell RA (2006) Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1. *Immunity* 24:317-327.

- Sweatt JD (2010) Neuroscience. Epigenetics and cognitive aging. *Science* 328:701-702.
- Szabo G, Mandrekar P (2009) A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. *Alcohol Clin Exp Res* 33:220-232.
- Szabo G, Zakhari S (2011) Mechanisms of alcohol-mediated hepatotoxicity in human-immunodeficiency-virus-infected patients. *World J Gastroenterol* 17:2500-2506.
- Taguchi T, Mitcham JL, Dower SK, Sims JE, Testa JR (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, Akira S (2004) TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16:3-9.
- Tang SC, Lathia JD, Selvaraj PK, Jo DG, Mughal MR, Cheng A, Siler DA, Markesbery WR, Arumugam TV, Mattson MP (2008) Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol* 213:114-121.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP (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.
- Tanga FY, Nutile-McMenemy N, DeLeo JA (2005) The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5856-5861.
- Tedgui A, Mallat Z (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 86:515-581.

- Ting JP, Kastner DL, Hoffman HM (2006) CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol* 6:183-195.
- Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, Williams BR, Major J, Hamilton TA, Fenton MJ, Vogel SN (2002) TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 3:392-398.
- Trendelenburg G (2008) Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J Cereb Blood Flow Metab* 28:867-881.
- Uesugi T, Froh M, Arteel GE, Bradford BU, Thurman RG (2001) Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. *Hepatology* 34:101-108.
- Valverde F (2002) [Structure of the cerebral cortex. Intrinsic organization and comparative analysis of the neocortex]. *Rev Neurol* 34:758-780.
- Valles SL, Blanco AM, Pascual M, Guerri C (2004) Chronic ethanol treatment enhances inflammatory mediators and cell death in the brain and in astrocytes. *Brain Pathol* 14:365-371.
- Valles SL, Blanco AM, Azorin I, Guasch R, Pascual M, Gomez-Lechon MJ, Renau-Piqueras J, 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.
- van de Veerdonk FL, Netea MG, Dinarello CA, Joosten LA (2011) Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol* 32:110-116.
- van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H, Huth M, Mildner A, Schmidt-Supprian M, Lassmann H, Prinz MR, Pasparakis M (2006) Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central

nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nat Immunol* 7:954-961.

Vanzani MC, Iacono RF, Caccuri RL, Berria MI (2005) Immunochemical and morphometric features of astrocyte reactivity vs. plaque location in Alzheimer's disease. *Medicina (B Aires)* 65:213-218.

Wang JJ, Durazzo TC, Gazdzinski S, Yeh PH, Mon A, Meyerhoff DJ (2009) MRSI and DTI: a multimodal approach for improved detection of white matter abnormalities in alcohol and nicotine dependence. *NMR Biomed* 22:516-522.

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA (2001) Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2792-2796.

Weberpals M, Hermes M, Hermann S, Kummer MP, Terwel D, Semmler A, Berger M, Schafers M, Heneka MT (2009) NOS2 gene deficiency protects from sepsis-induced long-term cognitive deficits. *J Neurosci* 29:14177-14184.

Weiss JM, Downie SA, Lyman WD, Berman JW (1998) Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier. *J Immunol* 161:6896-6903.

Wen H, Ting JP, O'Neill LA (2012) A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases--did Warburg miss inflammation? *Nat Immunol* 13:352-357.

WHO (2008) Global Status Report on Alcohol, 2004, 2008. In. Geneva: Department of Mental Health and Substance Abuse.

Wild E, Bjorkqvist M, Tabrizi SJ (2008) Immune markers for Huntington's disease? *Expert Rev Neurother* 8:1779-1781.

Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M (2006) Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique

- domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17513-17518.
- Witt ED (2010) Research on alcohol and adolescent brain development: opportunities and future directions. *Alcohol* 44:119-124.
- Wu J, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2010) Involvement of the AIM2, NLRC4, and NLRP3 inflammasomes in caspase-1 activation by *Listeria monocytogenes*. *J Clin Immunol* 30:693-702.
- Wu TT, Chen TL, Chen RM (2009) Lipopolysaccharide triggers macrophage activation of inflammatory cytokine expression, chemotaxis, phagocytosis, and oxidative ability via a toll-like receptor 4-dependent pathway: validated by RNA interference. *Toxicol Lett* 191:195-202.
- Wu YJ, Tang YF, Xiao ZC, Bao ZM, He BP (2008) NG2 cells response to axonal alteration in the spinal cord white matter in mice with genetic disruption of neurofilament light subunit expression. *Mol Neurodegener* 3:18.
- Xia Y, Yamagata K, Krukoff TL (2006) Differential expression of the CD14/TLR4 complex and inflammatory signaling molecules following i.c.v. administration of LPS. *Brain Res* 1095:85-95.
- Yamada M, Kawai M, Kawai Y, Mashima Y (1999) The effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on corneal angiogenesis in the rat. *Curr Eye Res* 19:300-304.
- Yuan J, Yankner BA (2000) Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407:802-809.
- Zahr NM, Sullivan EV (2008) Translational Studies of Alcoholism: Bridging the Gap. *Alcohol Res Health* 31:215-230.

